



(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/574, 33/577, C07K 14/82	A1	(11) 国際公開番号 WO97/10333 (43) 国際公開日 1997年3月20日 (20.03.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02654 (22) 国際出願日 1996年9月17日 (17.09.96) (30) 優先権データ 特願平7/236264 1995年9月14日 (14.09.95) JP 特願平7/331023 1995年11月27日 (27.11.95) JP 特願平8/179885 1996年6月20日 (20.06.96) JP 特願平8/229469 1996年8月30日 (30.08.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP) (72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 岸本利彦 (KISHIMOTO, Toshihiko) [JP/JP] 〒244 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP)		田村隆明 (TAMURA, Taka-aki) [JP/JP] 牧野泰孝 (MAKINO, Yasutaka) [JP/JP] 古倉健嗣 (KOKURA, Kenji) [JP/JP] 熊谷洋一 (KUMAGAI, Yoichi) [JP/JP] 〒263 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千葉大学理学部生物学科内 Chiba, (JP) (74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 受はの際にの補正の期再公であり、補正書受領の際には再公開される。
(54) Title: NOVEL PROTEINS REMARKABLY EXPRESSED IN LIVER CANCER, GENES ENCODING THE SAME, ANTIBODIES AGAINST THE SAME, AND METHOD FOR DETECTING THE EXPRESSION OF THE SAME (54) 発明の名称 肝癌において顕著に発現される新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、それに対する抗体、並びに該発現を検出する方法 <div data-bbox="584 1386 941 1659" data-label="Figure"> </div> (57) Abstract Novel proteins (CRTI, HRPI and GADII) showing elevated expression in the course of carcinogenesis; novel genes encoding these proteins; antisense genes of these genes; antibodies against these proteins; and a method for monitoring liver cancer by using the above-mentioned proteins, genes or antibodies. Genes expressed specifically in rat liver cancer are extracted and those showing elevated expression in liver cancer are isolated. Their cDNAs of the full length are obtained and thus the base sequences of these genes are determined. Thus it is confirmed that these genes are those specific to liver cancer. Further, the amino acid sequences encoded by the above-mentioned genes are determined and proteins having these amino acid sequences are expressed in recombinant <i>Escherichia coli</i> . Furthermore, antibodies against these proteins are constructed. Then it is clarified that the expression of these proteins can be detected by using the above-mentioned antibodies and the onset of liver cancer can be monitored by detecting the above-mentioned genes.		

(57) 要約

本発明は、発癌過程で発現が増加する新規な蛋白質（CRTI、HRPI及びGADII）、該蛋白質をコードする新規な遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子及び該蛋白質に対する抗体の提供を目的とする。また、本発明は、上記蛋白質、上記遺伝子又は上記抗体を用いて肝癌のモニター方法を提供することを目的とする。本発明は、ラット肝癌に特異的に発現している遺伝子を抽出し、肝癌で発現が増加する遺伝子を単離し、完全長のcDNAを得て、該遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子が肝癌特異的な遺伝子であることを確認した。

さらに、上記遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列を有する蛋白質を組み換え体大腸菌に発現させた。

また、上記蛋白質に対する抗体を作製した。

そして、上記抗体を用いて、上記蛋白質の発現を検出すること、及び上記遺伝子を検出することで肝癌の発症のモニターが可能であることを明らかにした。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LK	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GAB	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア共和国
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	VI	ベトナム	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	韓国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
		LK	スリランカ	RO	ルーマニア		

明細書

肝癌において顕著に発現される新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、それに対する抗体、並びに該発現を検出する方法

技術分野

本発明は、肝癌において発現が顕著な蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子、該蛋白質に対する抗体、並びに該蛋白質又は該遺伝子の発現を検出する方法に関する。

背景技術

癌の発症は遺伝子の何らかの異常によって起こることが知られており、特に、遺伝子の転写レベルでの変動異常が癌の発症の主たる原因と考えられている（『Science』Vol. 222、1983年、pp 765～771）。癌の発症機構の解明のため、発癌過程で発現状態が変化する蛋白質およびそれをコードする遺伝子、または、組織間で発現状態が変化する蛋白質およびそれをコードする遺伝子の取得は1980年頃よりさかんに行われてきた。例えば、癌組織を生化学的に分析し正常組織との違いを探し出すことで取得された癌特異的な蛋白質である α -フェトプロテインやCEAの存在が知られている。

これらの物質の同定には、癌組織に対するモノクローナル抗体を作製し、得られたモノクローナル抗体の中から、癌組織にのみ反応する抗体を選別し、次いでこのモノクローナル抗体に反応する抗原となるべき物質を同定していく方法が用いられてきた。

これらの方法により得られる情報は、ほとんどが蛋白質に関するもので、遺伝子は直接には得られない。そのため得られた蛋白質からの遺伝子の取得は、遺伝子工学的な手法を用いて、遺伝子ライブラリーと呼ばれる遺伝子の集団から選択

する方法が用いられていた。

具体的には、この選択方法は、『Molecular Cloning Second Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年）chapter 8, 9, 12に示されるように、得られた蛋白質の情報をもとに遺伝子プローブと呼ばれるものを作製し、この遺伝子プローブに対応する遺伝子を遺伝子ライブラリーよりコロニー／ブランクハイブリダイゼーションという方法により取得するものである。

また、同書chapter 8, 9, 11, 12にはモノクローナル抗体を用いて遺伝子ライブラリーから目的とする遺伝子をスクリーニングする方法が示されている。

しかしながらこれらの方法を用いることでは、目的とする蛋白質が量的に多いこと、あるいは、モノクローナル抗体を用いる場合には抗原蛋白質が細胞表面のものでありかつ抗原性の高いものであることが必要条件となっているため、これらに該当しない蛋白質は、取得することが非常に困難であり、従ってその蛋白質をコードする遺伝子の取得も非常に困難であった。

本発明は、以上説明した従来のいくつかの公知の方法ではなく、全く異なる方法を用いることで、肝癌組織での発現が正常肝組織に比べて上昇している遺伝子を単離するものである。

すなわち、本発明は、発癌過程で発現が増加する新規な蛋白質、該蛋白質をコードする新規な遺伝子及び該蛋白質に対する抗体の提供を目的とするものである。

また、本発明は、該蛋白質、該遺伝子の発現を検出することにより、肝癌の発症及び進行程度をモニターする方法を提供することを目的とするものである。

発明の開示

本発明者は、前記の目的を達成するために、鋭意検討を重ねた結果、サブトラクション法を用いてラット肝癌に特異的に発現している遺伝子を抽出し、ドット

スクリーニング法を用いて肝癌で発現が増加する遺伝子を単離した。そして、肝癌 cDNA ライブラリーから該遺伝子の完全長の cDNA を得て、該遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、該遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定した。

また、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法により該 cDNA が肝癌特異的な遺伝子であることを確認した。さらに、該 cDNA がコードする蛋白質を組み換え体大腸菌に発現させ、該蛋白質が天然物と同じ機能を有することを確認した。

上記の手段により、肝癌に特異的な新規なラットの蛋白質 CRTI (又は HTF と呼ぶ)、HRPI 及び GADII (又は CSAD と呼ぶ) 及びそれらの蛋白質をコードする遺伝子を単離した。また、肝癌に特異的な新規なヒトの蛋白質 GADII 及びそれをコードする遺伝子を単離した。

さらに、上記蛋白質を該蛋白質が由来する種以外のヒトを除く哺乳動物に免疫し、該蛋白質に対する抗体を作製し、該蛋白質の抗原性を確認した。

また、上記の遺伝子、CRTI 遺伝子、HRPI 遺伝子及び GADII 遺伝子がラット及びヒトの各組織からノーザンブロットハイブリダイゼーション法により検出されることを見いだした。

そして、これらの知見より、前記抗体を用いて前記蛋白質の発現を検出することにより、癌、特に肝癌の発症及び進行程度のモニタが可能であることを明らかにした。また、前記蛋白質をコードする遺伝子を検出することで癌、特に肝癌の発症、及び進行程度のモニタが可能であることを明らかにした。

図面の簡単な説明

図 1 A 及び 1 B は、実施例 1 で肝癌からサブトラクト法により得た遺伝子ライブラリーから抽出した DNA をメンブランに固定し、ドットブロットスクリーニングを行った結果を表す図である。図 1 A は、肝癌 polyA RNA より作製した cDNA プローブでスクリーニングを行った結果を表す図であり、図 1 B は、

正常肝臓 p o l y A RNAより作製した c D N Aプローブでスクリーニングした結果を表す図である。矢印 1 は、肝癌で発現の増加する遺伝子のドットであり、矢印 2 は、肝癌で発現の増加する遺伝子のドットである。

図 2 A 及び 2 B はそれぞれ、実施例 3 および 4 において作製したプローブ（それぞれプローブ A 及びプローブ B）を用いて、ラット正常肝臓と 7 カ月肝癌を用いた系において、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析結果を示す写真であり、左が正常肝（n o r m a l）を示し、右欄が肝癌（H C C）を示す。

図 3 は、実施例 3、実施例 1 4 及び実施例 1 6 で使用した p E T 3 a ベクターを表す図である。で取得した C R T I - B 遺伝子を導入するに用いたヒスチジンタグを導入した p E T 3 a ベクターを示す図である。

図 4 は、ヒト肝臓癌組織及び同一患者の非癌部肝臓組織からそれぞれ全 R N A を調製し、それらのゲル電気泳動を用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析結果を示す写真である。レーン 1 が、ヒト肝癌 R N A、レーン 2 がヒト非癌部 R N A（同じ患者の正常部分）を泳動した結果である。矢印で示したバンドが目的のバンドである。

図 5 は、実施例 1 で作製した各種肝癌組織のウェスタンブロット（蛋白レベル分析）の結果を示す写真である。右より、マーカー（ラダーの分）、r e c（ポジティブコントロール、実施例 4 で作成した C R T I）、N（ノーマル肝）、1（発癌後 1 月肝）、3（発癌後 3 月肝）、5（発癌後 5 月肝）、7（発癌後 7 月肝）である。

図 6 は、ヒト各種癌細胞を用いたウェスタンブロットの結果を示す写真である。右からポジティブコントロール、L i 2 1、L i H M、L i N M（以上ヒト肝癌細胞）、R E R F（ヒト肺癌細胞）、A Z（ヒト胃癌細胞）、H e c 1（ヒト子宮癌細胞）、A l e x（ヒト肝癌細胞）、M E W O（ヒトメラノーマ）、P a C a（ヒトすい臓癌細胞）である。図中矢印で示されたバンドが C R T I である。

図7は、CRTI遺伝子のラット組織間分布の、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による結果を示す写真である。図中矢印で示されたバンドがCRTI遺伝子由来のバンドである。

図8は、CRTI遺伝子のヒト組織間分布のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による結果を示す写真である。矢印で示されたバンドがCRTI遺伝子由来のバンドであり、レーン番号1は心臓(Heart)、2は脳(Brain)、3は胎盤(Placenta)、4は肺(Lung)、5は肝臓(Liver)、6は骨格筋(Skeletal Muscle)、7は腎臓(Kidney)、8はすい臓(Pancreas)を示す。

図9は、正常肝臓及び肝癌のmRNAについて、HRPI遺伝子をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った結果を表す図である。レーン1は、正常肝臓のmRNAのレーン、レーン2は、DEN投与12時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン3は、DEN投与24時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン4は、DEN投与48時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン5は、DEN投与1カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン6は、DEN投与3カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン7は、DEN投与5カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン9は、DEN投与7カ月後の肝癌のmRNAのレーンであり、矢印9は、HRPI mRNAのバンドの位置を表す。

図10は、正常肝臓及び肝癌のmRNAについて、GADII遺伝子をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーション解析を行った結果を表す図である。レーン1は、正常肝臓のmRNAのレーン、レーン2は、DEN投与12時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン3は、DEN投与24時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン4は、DEN投与48時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン5は、DEN投与1カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン6は、DEN投与3カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン7は、DEN投与5カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン8は、DEN投与7カ月後の肝癌のmRNAのレーンであり、矢印9は、GADII mRNAのバンドの位置を表している。

図11は、組み換え体HRPI部分蛋白質についてSDS-PAGE電気泳動を行った結果を表す図である。レーン1は、組み換え体大腸菌で作製された蛋白質のレーン、レーン2は、精製組み換え体HRPI部分蛋白質のレーンであり、矢印3は、HRPI部分蛋白質のバンドの位置を表している。

図12は、実施例15で使用したpBluebacIIIベクターを表す図である。

図13は、組み換え体HPR IをSDS-PAGE電気泳動を行った結果を表す図である。レーン1は、野生のSf9細胞が発現する蛋白質のレーン、レーン2は、組み換え体Sf9細胞が発現する蛋白質のレーンであり、矢印3は、組み換え体HRPIのバンドの位置を表している。

図14は、組み換え体GADIIを10%SDS-PAGE電気泳動を行った結果を表す図である（レーン1）。矢印は、組み換え体GADIIのバンドの位置を表している。

図15A及び15Bは、HRPI全長蛋白質を含む試料と抗HRPI抗体とを反応させウェスタンブロット解析を行った結果を表す図である。図15Aは、組み換え体HRPI全長蛋白質を含む試料と抗HRPI抗体とを反応させウェスタンブロット解析を行った結果を表す図であり、図15Bは、ラット肝臓抽出液と抗HRPI抗体とを反応させウェスタンブロット解析を行った結果を表す図である。図15A中のレーン1は、組み換え体HRPIを泳動したレーンであり、レーン2は、肝癌組織抽出液を泳動したレーンであり、矢印3は組み換え体HRPIのバンドの位置を表す。図15B中の、レーン4は、正常肝臓抽出液を泳動したレーンであり、レーン5は、DEN投与7カ月後の肝癌抽出液を泳動したレーンであり、矢印6はHRPIのバンドの位置を表す。

図16は、HRPI遺伝子の各臓器での発現を表す図である。レーン1は、心臓のmRNAを泳動したレーン、レーン2は、脳のmRNAを泳動したレーン、レーン3は、脾臓のmRNAを泳動したレーン、レーン4は、肺のmRNAを泳

動したレーン、レーン5は、肝臓のmRNAを泳動したレーン、レーン6は、骨格筋のmRNAを泳動したレーン、レーン7は、腎臓のmRNAを泳動したレーン、レーン8は、精巣のmRNAを泳動したレーンであり、矢印9は、HRPI mRNAのバンドの位置を表している。

図17は、GADII遺伝子の各臓器での発現を表す図である。レーン1は、心臓のmRNAを泳動したレーン、レーン2は、脳のmRNAを泳動したレーン、レーン3は、脾臓のmRNAを泳動したレーン、レーン4は、肺のmRNAを泳動したレーン、レーン5は、肝臓のmRNAを泳動したレーン、レーン6は、骨格筋のmRNAを泳動したレーン、レーン7は、腎臓のmRNAを泳動したレーン、レーン8は、精巣のmRNAを泳動したレーンであり、矢印9は、GADII mRNAのバンドの位置を表している。

発明を実施するために最良の形態

本発明は、肝癌組織での発現が正常肝組織に比べて上昇している蛋白質、それらをコードする遺伝子、それらに特異的な抗体並びに、それらの蛋白質及び遺伝子を検出することによるガンのモニター方法である。

本発明の特徴は、以下の通りである。

1. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。
2. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質である。
3. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする前記2に記載の蛋白質である。
4. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んで

なるDNAである。

5. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNAである。

6. 配列表の配列番号2で表される塩基配列を含むDNAである。

7. 配列表の配列番号2で表される塩基配列の500番目のAから2520番目のAまでの塩基配列を含むDNAである。

8. 配列表の配列番号2で表される塩基配列の515番目のAから1315番目のCまでの塩基配列を含むDNAである。

9. 配列表の配列番号2で表される塩基配列の1番目のCから499番目のTまでの塩基配列を含むDNAである。

10. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

11. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

12. 配列表の配列番号2で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

13. 配列表の配列番号2で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

14. 化学修飾された4～13のいずれか一つに記載のDNAである。

15. 前記4～13のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNAである。

16. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNAである。

17. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。
18. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。
19. 化学修飾された前記16～18のいずれか一つに記載のRNAである。
20. 前記16～18のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNAである。
21. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体である。
22. ヒトCRTI及びラットのCRTIに反応することを特徴とする前記21に記載の抗体である。
23. 前記1～3のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、前記21又は22に記載の抗体を用いる方法である。
24. 哺乳動物の組織中に存在する前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質を前記21又は22に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。
25. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記24に記載のガンの検出方法である。
26. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、前記4～14のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法である。
27. 哺乳動物の組織中に存在する前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを前記4～14のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

28. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記27に記載のガンの検出方法である。

29. 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。

30. 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質である。

31. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする前記30に記載の蛋白質である。

32. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNAである。

33. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNAである。

34. 配列表の配列番号4で表される塩基配列を含むDNAである。

35. 配列表の配列番号4で表される塩基配列の25番目のAから924番目のGまでの塩基配列を含むDNAである。

36. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

37. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

38. 配列表の配列番号4で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上

から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

39. 配列表の配列番号4で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

40. 化学修飾された前記32～39のいずれか一つに記載のDNAである。

41. 前記32～39のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNAである。

42. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNAである。

43. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。

44. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。

45. 化学修飾された前記42～44のいずれか一つに記載のRNAである。

46. 前記42～44のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNAである。

47. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体である。

48. 前記29～31のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、前記47に記載の抗体を用いる方法である。

49. 哺乳動物の組織中に存在する前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質を前記47に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

50. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記49に記載のガンの検出方法である。

51. 前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、前記32～40のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法である。

52. 哺乳動物の組織中に存在する前記29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを前記32～40のいずれか一つに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

53. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記52に記載のガンの検出方法である。

54. 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。

55. 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質である。

56. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする前記55に記載の蛋白質である。

57. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNAである。

58. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNAである。

59. 配列表の配列番号6で表される塩基配列を含むDNAである。

60. 配列表の配列番号6に記載の塩基配列の65番目のAから1582番目のAまでの塩基配列を含むDNAである。

61. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列の

うちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

62. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

63. 配列表の配列番号6で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

64. 配列表の配列番号6で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

65. 化学修飾された前記57～64のいずれか一つに記載のDNAである。

66. 前記57～64のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNAである。

67. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNAである。

68. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。

69. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。

70. 化学修飾された前記67～69のいずれか一つに記載のRNAである。

71. 前記67～69のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNAである。

72. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体である。

73. ラットGADI I に反応することを特徴とする前記72に記載の抗体で

ある。

74. 前記54～56のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、前記72又は73に記載の抗体を用いる方法である。

75. 哺乳動物の組織中に存在する前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質を前記72又は73に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

76. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記75に記載のガンの検出方法である。

77. 前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、前記57～65のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法である。

78. 哺乳動物の組織中に存在する前記54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを前記57～65のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

79. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記78に記載のガンの検出方法である。

80. 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。

81. 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質である。

82. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする前記81に記載の蛋白質である。

83. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNAである。

84. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNAである。
85. 配列表の配列番号8で表される塩基配列を含むDNAである。
86. 配列表の配列番号8に記載の塩基配列の72番目のAから1550番目のGまで塩基配列を含むDNAである。
87. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。
88. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。
89. 配列表の配列番号8で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。
90. 配列表の配列番号8で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。
91. 化学修飾された前記83～90のいずれか一つに記載のDNAである。
92. 前記83～90のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNAである。
93. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNAである。
94. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。
95. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNAである。

Aである。

96. 化学修飾された前記93～95のいずれか一つに記載のRNAである。

97. 前記93～95のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNAである。

98. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体である。

99. ヒトGAD IIに反応することを特徴とする前記98に記載の抗体である。

100. 前記80～82のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、前記98又は99に記載の抗体を用いる方法である。

101. 哺乳動物の組織中に存在する前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質を前記98又は99に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

102. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記102に記載のガンの検出方法である。

103. 前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、前記83～91のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法である。

104. 哺乳動物の組織中に存在する前記80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを前記83～91のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

105. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記104に記載のガンの検出方法である。

本発明は、肝癌において特異的に発現される蛋白質及びそれをコードする遺伝子である。それらは、後述の実施例中で開示しているように、ラットの肝臓から、

サブトラクション法により肝癌に特異的に存在する遺伝子を単離し、塩基配列を決定することより取得された。そして、前記遺伝子より、肝癌において特異的に発現される蛋白質が確認及び単離された。

このようにして、本願発明者らは、新たに4種類の蛋白質及び遺伝子を同定及び単離した。これらの肝癌に特異的な蛋白質は、それぞれ、ラットCRTI、ラットHRPI、ラットGADII及びヒトGADIIと命名した。それらの蛋白質のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子配列を、それぞれ、配列表の配列番号1及び2、3及び4、5及び6、7及び8に示す。

異種間の同一機能の蛋白質については、種によってそのアミノ酸配列にいくらかの相違はあるが、30%~40%以上のホモロジーがあることが一般的に知られている。従って、本発明において単離した蛋白質(CRTI又はHRPI)についても、該蛋白質と同じ機能を有し、かつ該蛋白質とのホモロジーが30%以上(好ましくは40%以上)である蛋白質をラット以外の哺乳動物も有していることは充分考えられる。なお、ここで意味するホモロジーがあるということは、一般的に、同族アミノ酸をポジティブとカウントする算出法によるものであり、アミノ酸鎖の長さが異なる場合は、アミノ酸鎖が短い方の蛋白質の長さに対して、ホモロジーがある部分の割合がいくらかを表すものである。

したがって、本発明に係る蛋白質は以下の2点の特徴を有するものを意味する。

①肝臓組織において、肝癌における発現が正常細胞における発現に比べて顕著に増加していること。

②配列表に記載の塩基配列と30%以上、好ましくは40%以上のホモロジーを有すること。さらに、この特徴は、由来する動物の種によらないものである。

ここで、肝癌で特異的にみられる(発現する)かどうかについては、種々の公知の方法が使用可能であるが、例えば後で記載する実施例に示した方法を用いて確認することも好ましい方法である。

自然の変異により又は人工の変異(例えば、『Molecular Clon

ing 2nd Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年) 15. 1～15. 113頁を参照)によりポリヌクレオチドの構造の一部を変化させることが可能であり、これにより該ポリヌクレオチドがコードする蛋白質を変異させることが可能である。本発明の蛋白質についても、配列表の配列番号1、3、5又は7に記載のアミノ酸配列の1又は2以上のアミノ酸が置換、欠失又は付加された変異体蛋白質を作製することが可能である。本発明の蛋白質は、該蛋白質に対する抗体により特異的に認識されるものであるので、本発明の変異体蛋白質は、該抗体により認識されること(該抗体により認識される程度に変異させたものであること)を特徴とする。

本発明にかかる、CRTI、HRPI、GADIIをコードする遺伝子は、それぞれ上で定義したCRTI、HRPI、GADIIをコードする遺伝子である。

本発明は、前記の蛋白質、即ちCRTI、HRPI及びGADIIの抗原性について、実施例に例示するように、該蛋白質が由来する種以外でありかつヒト以外の哺乳動物に免疫することで容易に抗体が得られるものであることを明らかにするものである。したがって、本発明のCRTI、HRPI、GADIIに対する抗体はそれぞれ、同様の方法、すなわち該蛋白質が由来する種以外の動物に免疫感作することにより得られる抗血清及びポリクローナル抗体をその範囲内に含む。また、免疫原として、蛋白質の一部であっても該蛋白質の一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いることも当業者にとってはよく用いられる方法である。該蛋白質の一部は、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。なお、蛋白質の一部としては、免疫原として充分作用させるために、8アミノ酸残基以上であることが好ましい。

また、抗原性が明らかとなった物質については、免疫感作によってポリクローナル抗体が得られるならば、該免疫した動物のリンパ球を用いたハイブリドーマによりモノクローナル抗体を産生可能である(例えば、『Antibodies

A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) Chapter 6を参照)。したがって本発明のCRTI、HRPI、GADIIに対する抗体とはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体をその範囲内に含むものである。

CRTI、HRPI又はGADIIの検出については、抗体を用いる方法、さらに酵素反応を利用した酵素反応を用いる方法、それぞれの遺伝子を検出する方法が挙げられる。

抗体を用いる方法としては具体的には、①前記各蛋白質に対する抗体を用いて該蛋白質を検出する方法、②前記各蛋白質に対する抗体および該抗体の標識二次抗体を用いて、該蛋白質を検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素(RI)、酵素、アビジン又はビオチン、もしくは蛍光物質(FITCやローダミン等)が利用される。

酵素反応を利用した抗体を用いる方法としては、例えば、ELISAが挙げられる。

また、遺伝子を検出する方法としては具体的には、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法やRT-PCR法(『Current Protocols in Molecular Biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) Chapter 15)又はインサイチュハイブリダイゼーション法(同書Chapter 14)が挙げられる。

なお、ハイブリダイズの条件は、プローブの長さや使用するメンブランにより最適な条件が異なることが知られており、該条件の設定については、当業者にとって容易に選択可能である。

本発明の実施例では、使用したメンブランの性質と、得ようとしたプローブの長さにおける最適な条件を開示するものであり、メンブランやプローブの長さが異なれば当然異なるハイブリダイズ条件でもハイブリダイズし得る。例えば、ピ

ロリン酸ナトリウムがなくてもハイブリダイズする場合もある。1つの好適な実施の態様は以下のごとくである。

ハイブリダイズ条件：

①プレハイブリダイゼーション条件

5～10 x SSC (SSC溶液の各成分の濃度が5～10倍である)

5～10 x Denhardt's

1M以下のピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

30～50%のホルムアミド

0.1～1%のSDS

約100 μ g/ml 酵母 tRNA

約100 μ g/ml 熱変性DNA

反応温度 35 ないし 42℃

反応時間 50分以上1時間10分以下

②ハイブリダイゼーション条件

5～10 x SSC

5～10 x Denhardt's

1M以下のピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

30～50%ホルムアミド

1%以下のSDS

約100 μ g/ml 酵母 tRNA

約100 μ g/ml 熱変性DNA

1×10^5 ないし 2×10^6 cpm/ml cDNAプローブ

反応温度 35 ないし 42℃

反応時間 12時間以上20時間以下

なお、上記の条件のうち、ピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)、又はSDSは特にバックグラウンドに基づく改良のために主に使用している。また、これら

の遺伝子の検出のために用いるプローブはDNAでもRNAでもどちらでも用いることができる。

さて、ヒトのゲノムの塩基数は 3×10^9 個といわれている。16塩基のDNAは 4^{16} 種類存在するので、この長さのDNAがあればヒトの蛋白質を全て識別できることになる。

すなわち、プローブとして必要な長さは理論的には16塩基である。実用上もこの長さ以上であることが望ましいことは言うまでもないが、実用的には、合成効率、操作性その他の点より12塩基以上のものが用いられることが多い。また、プローブとして用いる箇所は非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。

また、プローブとして用いる箇所は、GC含有率が30～70%であれば、非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。

本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNA（以下両者を合わせてアンチセンスポリヌクレオチドということがある。）には、塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが、天然には存在しないものを含めて全て含まれる。

また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体には、その立体構造や機能がポリヌクレオチドと類似するものが全て含まれる。例えば、ポリヌクレオチドの3'末端もしくは5'末端に他の物質が結合したものとポリヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において、置換や欠失や付加の修飾が生じた物質、天然に存在しないような塩基、糖、リン酸を有するものや、糖ーリン酸骨格以外の骨格を有するものである。

該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチドのいかなる部分にハイブリダイズするものであってもよい。なお、該蛋白質の全部又は一部をコードするmRNAの一部に対して相補的な塩基配列を有し、該mRNAにハイブリダイズする

ものが好ましい。特に好ましくは、少なくともCRTI、HRPI又はGADI IをコードするmRNAにハイブリダイズするものである。

また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、組織や細胞における本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチドの存在やその発現状況を調べるための研究用ポリヌクレオチドプローブとして、直ちに使用可能である。また、診断用ポリヌクレオチドプローブとしても使用可能である。なお、プローブとしては、12塩基以上且つGC含有率が30ないし70%であるものが好ましく、16塩基以上且つGC含有率が30ないし70%であるものが、特に好ましい。

また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体を使用して、本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質の発現を調節することが可能である。これらは該蛋白質をコードする遺伝子もしくはmRNAにハイブリダイズして該蛋白質の発現を抑制することが期待されるので、該蛋白質が関与する機能の異常に基づく疾患の治療薬として使用可能である。すなわち、該アンチセンスポリヌクレオチドやその誘導体よりアンチセンス医薬品を開発することが可能である。

現在一般に、アンチセンスポリヌクレオチド誘導体の例は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも1つが高められた誘導体であることが好ましいことが知られている。特に好ましくは、当該ポリヌクレオチド誘導体は、フォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体であることが知られている。本発明のポリヌクレオチド及びその誘導体についても、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体の製造方法については、例えば、『in Antisense Research and Applications』（CRC出版、フロリダ、1993年）に記載の方法を用いることが可能である。

例えば、天然型のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成したり、

本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質をコードする遺伝子を鋳型とするPCR法により本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを得ることができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機（例えば、パーキンエルマージャパン社製394型）を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されている説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を得ることができる。

DNA又はRNAを化学合成・酵素合成するときに、側鎖をメチル化すること、あるいはビオチン化すること、もしくはリン酸基部分のOをS置換すること等の化学的に修飾することはよく知られている。

化学合成時に導入できる修飾として、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコキシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化（フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体）、6) アミノ化、7) リン酸基のSをOに置換したDNA、RNAの合成が主として挙げられる。

また、酵素的に導入できる化学修飾としては、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコキシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化（フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体）、6) 酵素標識化（アルカリフォスファターゼ）が主に挙げられる。

例えば、配列表の配列番号2、4、6又は8に記載のDNAを化学合成するときに、上記の化学修飾を行い、配列表に示されたDNAそのものと異なるものを合成することが可能である。したがって、本発明のDNA及びRNAは、該化学修飾されたDNA及びRNAをその範囲に含むものである。

CRTI、HRPI又はGADIIの検出による癌の進行程度のモニターについては、被験者から採取した組織又は細胞中に該蛋白質が存するかを調べることにより行える。また、CRTI、HRPI又はGADIIが細胞外に分泌又は放

出される場合には、被験者の血液中のC R T I、H R P I又はG A D I Iの有無を調べることにより癌の進行程度のモニターが可能である。具体的には、前記のC R T I、H R P I又はG A D I Iの検出方法（抗体を用いる方法、酵素反応を利用した抗体を用いる方法、それぞれの遺伝子を検出する方法）と同様に行えばよい。

また、遺伝子による癌の進行程度のモニターについては、被験者から採取した組織又は細胞中に該遺伝子が存するかを調べることにより行える。遺伝子の検出方法は、前記のようにノーザンブロットハイブリダイゼーション法やR T - P C R法、インサイチュハイブリダイゼーション法が挙げられる。

実施例

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳述するが、本発明はこの例に限定されるものではない。

（実施例1）肝癌で発現が増加する蛋白質及びその遺伝子

I. 肝癌で発現の増加する蛋白質をコードする遺伝子の単離

1. 肝癌ラットの作製

肝癌ラットは、ソルトファーバー法（『Nature』Vol. 263、1976年、pp 701～703）を基として作製した。実際には、5週齢のウィスター系ラット（船橋農場製）にジェチルニトロサミン（DEN）を腹腔内投与し、二週間後2-アミノアセチルフルオレン（AAF）を0.02%含むM飼料（オリエンタル酵母製）の経口投与を開始し、さらにその一週間後再生肝手術を施した。DEN投与後12、24、48時間及び1、3、5、7カ月後に肝臓を摘出し、後のRNA調製に使用した。

また比較対照として、正常な増殖を示す再生肝臓を、再生肝手術後12、24、48時間後に肝臓を摘出することで用意し、のちの解析に使用した。

2. RNAの調製

全RNAは、『Methods in enzymology』Vol. 154 (academic Press Inc.、1987年) pp3~28に記載の方法を基として調製した。実際には、

(1) 各肝臓を3gずつ液体窒素中で粉砕し、100mlの5.5M GTC溶液(グアニジンチオシアネート5.5mM、N-ラウロニルサルコシン0.5%、25mMクエン酸ナトリウム、pH7.0)に加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジネートした。

(2) 溶液を、3000rpm、10分間遠心分離した後、上清液をSW28スイングローター用遠心管(ベックマン製)に加えておいた比重1.6g/mlのセシウムトリフルオロ酢酸溶液(セシウムトリフルオロ酢酸(ファルマシア製)50%、100mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)(pH7.0))12mlに重層し、SW28スイングローターを用いて2500rpm、24時間、15℃で分離を行った。

(3) 沈殿物を、600μlの4M GTC溶液に溶かし、15000rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。1M酢酸を15μl、エタノール450μlを加え、15000rpm、10分間遠心分離し、沈殿を回収した。

(4) この沈殿を、適当量(約3ml)のTE溶液(1mM Tris-Cl(pH7.5)、1mM EDTA)に溶かし(溶けるまでTE溶液を加えた)、15000rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。

(5) 溶液と同量のフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpm、10分間遠心分離し、溶液部分を回収した。

(6) 溶液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で20分間放置後、15000rpmで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、適当量のTE溶液に溶かし、-80℃で保存した。各肝臓から5~7mgの全RNAが得られた。

(7) polyA RNAは、oligotex dT30 super™

(日本ロッシュ製)を用いて、取扱説明書の通りに行った。用いた全RNAの量は一回当たり1mgで、oligotex dT30 super™を750 μ lを用いてpolyA RNAの精製を行った。各肝臓において、1mgの全RNAから約20 μ gのpolyA RNAが得られた。

3. cDNAサブトラクション

これは、原らの方法(『Analytical Biochemistry』Vol. 214、1993年、pp58~64)に準じて行った(この文献は引用することにより本明細書の一部である)。実際には、

(1) 用いた材料となるpolyA RNAは、7カ月肝癌、及び正常肝臓のもので、各15 μ gを用いた。

①該polyA RNAは、それぞれoligotex dT30 super™に吸着させた後、その状態でcDNAの合成反応を行った。合成反応の条件は文献の通りに行った。

②肝癌のcDNA-oligotex dT30 super™には、ターミナルデオキシトランスフェラーゼ(宝酒造製)でpoly dC tailを付加し、EcoRI-(dG)₁₅プライマーとTaqポリメラーゼ(パーキンエルマー製)でセンス鎖のcDNAを合成した。

このセンス鎖cDNAと正常肝臓のcDNA-oligotex dT30 super™の間で該cDNAサブトラクション反応を行った。

③反応後得られたcDNA溶液はEcoRI-(dG)₁₅及びXhoI-(dT)₃₀の両プライマーを用いてPCR反応(『Current Protocols in Molecular Biology』(1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社)Chapter15に記載の方法に準じて増幅した。PCRの条件は、以下の組成の溶液で、1サイクルを94℃で90秒、次に55℃で2分、次に72℃で3分反応させることとして、25サイクル行った。

cDNA溶液	69 μ l
10x Taq 緩衝液 (パーキンエルマー製)	10 μ l
1.25mM dNTP	16 μ l
EcoRI - (dG) ₁₅ プライマー (2 μ g/ μ l)	2 μ l
XhoI - (dT) ₃₀ プライマー (2 μ g/ μ l)	2 μ l
Taq ポリメラーゼ (パーキンエルマー製) (5 u/ μ l)	1 μ l
計 100 μ l	

(2) ①サブトラクション処理後、得られた遺伝子ライブラリーをEcoRI (宝酒造製) で切断した。反応系は次の条件とした。

遺伝子溶液	10 μ l
10xH buffer	10 μ l (宝酒造製)
EcoRI	5 μ l (宝酒造製)
滅菌水	75 μ l
計 100 μ l	

反応温度 37℃

反応時間 一晚

②EcoRI切断後、100 μ lのフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10 μ lの3M酢酸ナトリウム (pH5.2) を加え、250 μ lのエタノールを加えた後、15000rpmで遠心分離し沈殿を回収した。

③回収した沈殿を70%エタノール1mlで洗浄し、乾燥させた後、75 μ lの滅菌水に溶解させた。これを下記組成の液として37℃で一晩反応させ、XhoIで切断した。

遺伝子溶液	75 μ l
1%BSA	10 μ l (宝酒造製)
10xH buffer	10 μ l (宝酒造製)

X h o I

5 μ l (宝酒造製)計 1 0 0 μ l

反応温度 3 7 °C

反応時間 一晚

(3) 1 0 0 μ l のフェノール／クロホルムを混合し、1 5 0 0 0 r p m で遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に 1 0 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (p H 5 . 2) を加え、2 5 0 μ l のエタノールを加えた後、1 5 0 0 0 r p m で遠心分離し沈殿を回収し、7 0 % エタノール 1 m l で沈殿を洗浄し乾燥した後、1 0 0 μ l の滅菌水に溶解させ、遺伝子ライブラリー溶液を調製した。

4. サブトラクション後の遺伝子のベクターへの導入

(1) p B l u e s c r i p t I I ベクター (ストラタジーン製) を E c o R I , X h o I (宝酒造製) で切断した。切断条件は、3 . (2) で示した条件を用いた。

(2) 切断された p B l u e s c r i p t I I ベクターの切断端の脱リン酸化を b a c t e r i a l a l k a l i n e p h o s p h a t a s e (宝酒造製) を用いて、6 5 °C で 1 時間反応させて行った後、1 0 0 μ l のフェノール／クロホルムを混合し、1 5 0 0 0 r p m で遠心分離し、水溶液部分を回収した。

(3) この溶液に 1 0 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (p H 5 . 2) を加え、2 5 0 μ l のエタノールを加えた後、1 5 0 0 0 r p m で遠心分離し沈殿を回収し、7 0 % エタノール 1 m l で沈殿を洗浄し乾燥した後、1 0 0 n g / μ l になるように滅菌水に溶解させた。

(4) 3 . で得られた遺伝子ライブラリー溶液と、切断、脱リン酸化を行った p B l u e s c r i p t I I ベクターを l i g a t i o n p a c k TM (日本ジーン製) の使用要領に従い、混合、反応させることでライブラリーの各遺伝子を

ベクターに挿入した。

5. サブトラクション後の遺伝子の大腸菌への導入

常法に従い、4. (4) で反応させた反応液を全て、E. coli JM109 のコンピテントセル（宝酒造製）に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900 μ lを加え、37℃、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

6. 遺伝子の抽出

(1) この大腸菌を、下記の組成のLB寒天培地に撒き、一晚培養することでコロニーを形成させた。

LB寒天培地の組成

アンピシリン（和光純薬製）100 μ g/ml

IPTG （宝酒造製） 0.1 mM

X-gal （宝酒造製） 0.004 %

形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを選択して後の遺伝子のスクリーニングに用いる種菌とした。

(2) 種菌を2000種類選択し、各々をアンピシリンを100 μ g/ml含む2mlのLB液体培地で培養した後、『Molecular Cloning Second Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年）Chapter 1に記載のアルカリ法で遺伝子を抽出した。

7. ドットブロットスクリーニング

(1) 抽出した遺伝子は、Bio Dot（バイオラッド製）を用いて各々2枚のナイロンメンブラン（ミリポア製）に結合させ、水酸化ナトリウム水溶液で遺伝子を変性させた後、UVクロスリンカー（ストラタジーン製）により固定を行った。遺伝子の変性は以下の条件で行った。

- ① 0.1 M 水酸化ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム溶液に 20 秒反応させ
- ② その後、0.2 M Tris-Cl (pH 7.5)、0.15 M 水酸化ナトリウム溶液と 2 分間反応させた。
- ③ その後、2 x SSC で 2 分間反応させた。

(2) 2. で作製した肝癌 poly A RNA 及び正常肝臓 poly A RNA より、放射性 CTP (α - 32 P-dCTP) (アマシャム製) を用いて AMV 逆転写酵素 (生化学工業社製) により逆転写反応を行うことで、それぞれの poly A RNA から cDNA プロブを作製した。

(3) (1) でナイロンメンブランに固定した遺伝子と (2) で作製した cDNA とを以下の条件でハイブリダイゼーションさせた。

① プレハイブリダイゼーション条件

5 x SSC

5 x Denhardt's

0.1 M ピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

50% ホルムアミド

0.5% SDS

100 μ g/ml 酵母 tRNA

100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA

反応温度 42°C

反応時間 1 時間

② ハイブリダイゼーション条件

5 x SSC

5 x Denhardt's

0.1 M ピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

50% ホルムアミド

0.5% SDS

100 μ g/ml 酵母 tRNA

100 μ g/ml 変性サケ精子DNA

(2) で作製した cDNA プローブ (5×10^5 cpm/ml)

反応温度 42°C

反応時間 16 時間

(5) その後、ナイロンメンブランを各々 500ml の 2xSSC (0.1% SDS を含む)、0.2xSSC、0.1xSSC の溶液の順番でそれぞれ 30 分間ずつ 60°C で洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。結果を図 1 に示す。得られたオートラジオグラフィーより、正常肝臓の cDNA プローブとの結合量に比べ肝癌の cDNA プローブとの結合の多い遺伝子を選択した。全部で少なくとも 31 確認した。このうちの 3 つを選択し、以下の実験に用いた。

8. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、『Molecular Cloning Second Edition』chapter 13 に記載の方法に準じて行った。実際には、得られた肝癌の cDNA プローブとの結合量の多い遺伝子の塩基配列の決定は、T7 sequence kit™ (ファルマシア製) を用いてジデオキシターミネイター法で pBluescript II 上に挿入した遺伝子部分の配列を読み取った。

9. ホモロジー解析

決定された遺伝子の塩基配列を DDBJ (DNA Data Base of Japan) のデータバンクに照会することで、ホモロジー解析を行った。その結果、上記の 3 つの遺伝子は、ホモロジーの見つからない新規遺伝子であることが判明した。これらの遺伝子をそれぞれ、CRTI 遺伝子、HRPI 遺伝子及び GADI 遺伝子と命名した。それぞれの遺伝子について、該遺伝子が完全長であるかどうか確認するために以下の解析を行った。

10. cDNA ライブラリーの作製

DEN投与後7カ月の肝癌組織より抽出したpolyA RNA 4 μ gからファルマシア製タイムセイバーcDNAシンセシスキット™を用いて、取扱い説明書にしたがってcDNA合成を行った。以下にその概要を説明する。

(1) ランダムプライマーを使用し、逆転写反応、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応により二本鎖cDNAを合成し、このcDNAの両端にNot I/EcoRIアダプターを付加するためT4DNAライゲース処理及びポリヌクレオチドキナーゼ処理を行った。これにより両端にEcoRI制限酵素切断部位を有するcDNAを得た。

(2) このcDNAを、 λ gt11クローニングベクター（ファルマシア製）にT4DNAリガーゼを用いて挿入し、GIGAPACK Gold™（ストラタジーン製）を用いてパッケージングを行い、 λ ファージの中にcDNAを導入し、遺伝子の単離に用いた。

11. 遺伝子の単離

遺伝子の単離は『Molecular Cloning Second Edition』Chapter 2に記載の方法に準じて行った。以下にその概要を示す。

(1) 10. で作製したcDNAを含むライブラリーをY1090r-大腸菌に接触させた後、0.7%寒天を含むNZY培地に混合し、1.5%寒天を含むNZY培地プレートに撒いた。42℃で6時間培養を行うことでcDNAを大量に含むプラークを形成させた後、このプレート上にニトロセルロースフィルター（イモビロン（ミリポア社の登録商標）、ミリポア製）をのせプラークを転写した。

(2) このフィルターを水酸化ナトリウムでプラーク中のcDNAを変性させた。変性の条件は7. (1) に記載の条件と同じで行った。

(3) 変性させたcDNAを75℃で2時間熱処理して固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションに用いたプローブには、8. で塩

基配列を決定したC R T I 遺伝子の一部分をランダムラベリング（ベーリンガーマンハイム製のランダムラベリングキットを使用した）で ^{32}P -d C T P 標識したものを用いた。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献に記載の条件にしたがった。

（４）ハイブリダイゼーションの結果、フィルターに固定したc D N A から得られたポジティブシグナルに対応するブランクからプローブ配列より長い配列を有する遺伝子を得た。

上記の操作を、３つの遺伝子、即ちC R T I、H R P I 及びG A D I I 遺伝子のそれぞれについて行い、それぞれの完全長の遺伝子を得た。

（実施例２）肝癌特異的な蛋白質のアミノ酸配列及び該蛋白質をコードする遺伝子の決定

１．遺伝子の大量調製

C R T I 遺伝子について以下の操作を行い、遺伝子を大量調整した。

（１）実施例１の１１．（４）又は（５）でN Z Y 寒天培地上に形成させたブランクから回収したλファージをS M 溶液に懸濁した。

（２）（１）の懸濁液 $50\mu\text{l}$ とY 1 0 9 0 r - 大腸菌 $20\mu\text{l}$ を混合し、 37°C 、 15 分間放置した。

（３）その後、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む 10ml N Z Y 培地に（２）で混合した溶液を移し、 37°C で 6 時間培養した。

（４） 8000rpm 、 5 分間遠心分離し、上清を回収した。

（５）該上清に、 5M N a C l を 1ml 、ポリエチレングリコール 6000 を 1.1g を加え、溶かした。

（６）該溶液を氷上に 1 時間置き、その後 10000rpm 、 4°C で 20 分間遠心分離を行った。

（７）沈殿を回収し、 $700\mu\text{l}$ のS M 溶液に懸濁した。

(8) クロロホルムを500 μ l 加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

(9) 5000 r p m、10分間遠心分離し、水層を回収した。

(10) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I (共にシグマ製) を各1 μ l ずつ加え、37℃で1時間放置したのち、20%ポリエチレングリコール6000 (0.8M NaCl) を600 μ l 加え、氷上に30分間放置した。

(11) 4℃で、15000 r p m、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

(12) この沈殿に500 μ l のSM溶液、50 μ l の5M NaCl、50 μ l の0.5M EDTAを加え、更に、400 μ l のフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

(13) 該溶液を室温で15000 r p m、5分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に1mlのエタノールを加え、15000 r p m、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

(14) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100 μ l のTE溶液 (Tris-Cl pH8.0 10mM、1mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

2. CRTI 遺伝子のベクターへの挿入

CRTI 遺伝子について以下の操作を行い、ベクターに挿入した。

(1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素Not I (宝酒造製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 μ l
0.1% BSA	10 μ l
0.1% Triton X100	10 μ l
Not I (宝酒造製)	2 μ l

RNase A (日本ジーン製)	1 μ l
10xH buffer (Takara製)	10 μ l
滅菌水	47 μ l
合計	100 μ l

反応温度 37℃

反応時間 4 時間

(2) その後、0.7% NuSieve™ GTG アガロース (宝酒造製) 電気泳動を行い、2.0 kbp 付近のDNAを切り出し、このDNAをGENE CLEAN II™ (フナコシ製) を用いて取扱説明書の通りにDNAを回収した。

(3) DNAを組み込むpBluescript II (ストラタジーン製) をNot Iで切断後脱リン酸化を行った。

①Not Iでの切断は、以下の系で行った。

pBluescript II (1 μ g/ μ l)	3 μ l
10xH buffer	2 μ l
0.1% BSA	2 μ l
0.1% Triton X100	2 μ l
Not I	2 μ l
滅菌水	10 μ l
合計	20 μ l

反応温度 37℃

反応時間 一晩

②その後、2 μ l 1M Tris pH8.0を加え、1 μ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造製)を加え、6

5℃で1時間放置した。

③その後、フェノール/CHCl₃抽出を常法に従い2回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE溶液にて100 ng/μlに溶かした。

(4) (2) で得られたDNAと、(3) で得られたpBluescript IIを、以下の系で反応させ、DNAをベクターに挿入した。

DNA ((2) で調製したもの)	5 μl
pBluescript II Not I切断物 (③で調製したもの)	1 μl
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン製)	2 μl
T4リガーゼ (日本ジーン製)	1 μl
滅菌水	11 μl
合計 20 μl	

反応温度 16℃

反応 2時間

3. CRTI、HRPI又はGADII遺伝子の大腸菌への導入

2. で作製したCRTI、HRPI又はGADII遺伝子を挿入したベクターを、それぞれ常法に従い反応液を全て、E. coli HB101コンピテントセル (宝酒造製) に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900 μlを加え、37℃、1時間置き、ベクターをE. coli HB101に導入した

。なお、このCRTI遺伝子 (CRTI-A) を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に平成7年11月21日に寄託 (受託番号FERM P-15302) し、その後、平成8年9月9日に国際寄託に移管した (受託番号FERM BP

—5658)。

4. 遺伝子の塩基配列の決定

(1) 3. で回収した *E. coli* HB101 を LB 寒天培地 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、 0.1 mM IPTG 、 0.004% X-gal 含有) に撒き、 37°C で 16 時間培養した。

(2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを 2 ml LB 培地 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含有) に植え、 37°C で 16 時間培養した

(3) その後、 12000 rpm 、1 分間遠心分離して集菌し、Magic Miniprep™ (プロメガ製) に従いプラスミド DNA 溶液を回収した。

(4) 回収した DNA を T7 シークエンシングキット (ファルマシア製) に従い、シークエンスし、全塩基配列を決定した。その結果、CRTI-A は全長遺伝子を含まないことが判明し、再度実施例 1 の 8. で塩基配列を決定した CRTI 遺伝子の一部分のかわりに配列表の配列番号 2 の 524 位から 1415 位までをプローブとしてランダムラベリング (ベーリンガー・マンハイム製のランダムラベリングキットを使用した) で ^{32}P -dCTP 標識したものをを用い CRTI 全長遺伝子の取得を実施例 1 の 11. に記載の方法で行った。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献に記載の条件にしたがった。その結果得られた遺伝子断片を実施例 2 の 1., 2., 3., に記載と同様の方法で大腸菌に導入した。この遺伝子断片をこの項目に記載の方法で塩基配列を決定した。その結果、配列番号 2 の 500 位から 1415 位までを含む CRTI 遺伝子断片が得られた。この遺伝子 (CRTI-B) を導入した組み換え体大腸菌 (*E. coli* HB101) を平成 7 年 11 月 21 日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に寄託 (受託番号 FERM P-15303) し、平成 8 年 9 月 9 日に国際寄託の移管した (受託番号 FERM BP-5659)。先に得られた CRTI-A と併せてコード領域全てを含む 2021 bp の CRTI 遺伝子が得られた。CRTI-A は、配列表の配列番号 2

の525位から2520位までを含む。

5. アミノ酸配列の決定

4. で決定した塩基配列から、CRTIのアミノ酸配列を決定した。CRTIのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

(実施例3) 肝癌の遺伝子発現レベルでの検出(診断)の可能性の確認

1. CRTI遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析
CRTI遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を、『Current Protocols in Molecular Biology』(1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社) Chapter 4に記載されているホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動を用いる方法に従い行った。用いたpolyA RNAの量は、各サンプルにつき500ngで、ラット正常肝臓及び実施例1で作製したDEN投与後7カ月の肝癌のpolyA RNAを用いたものについて行った。

(1) 実施例2でpBluescriptII上にのせたCRTI遺伝子の配列番号2の525番目から1415番目の部分を制限酵素処理にて、ベクターから切り出した。

(2) その後、制限酵素処理液をアガロースゲル電気泳動にかけて、目的とするCRTI遺伝子(525位から1415位まで)を分離した。

(3) (2)で分離したCRTI遺伝子をGENE CLONE II™(ファナコシ製)を用いて精製した。

(4) 精製したCRTI遺伝子をランダムプライムドDNAラベリングキット(ベーリンガーマンハイム製)を用いて製品取扱説明書に従い、 α - 32 P-dCTP(アマシャム製)を用いて 32 P-dCTP標識したCRTI遺伝子プローブを作製した。

(5) (4) で作製したプローブを用いて、正常肝臓と7カ月肝癌を用いた系において、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。この結果、肝癌で有意に増加する遺伝子としてCRTI遺伝子が検出された。これよりCRTI遺伝子を用いることで、肝癌と正常肝臓の識別が可能となること、すなわち、肝癌の診断が可能であることが判明した。結果を図2 (プローブA) に示す。オートラジオグラフィーでは、フィルムにはコダック社のXARフィルム、スクリーンにはデュポン社のライトニングプラスを用いて-80℃で24時間感光させた。図2中HCCは肝癌を表す。

(実施例4) 2. 5 kbのCRTI遺伝子の塩基配列の決定

図2 (プローブA) に明らかなように、CRTI遺伝子の実施例3のプローブを用いた肝癌由来のpoly A RNAについてのノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った結果、バンドが2本検出される。約2.0 kbに見られるバンドは配列表の配列番号2の500番目から2520番目の塩基配列の遺伝子に対応するものである。もう1つの約2.5 kbに見られるバンドに対応する遺伝子を実施例1の11. に記載されている方法で取得した。

得られた遺伝子について、実施例2の1. ~ 4. に記載されている方法で塩基配列を決定した。約2.0 kbの遺伝子の5' 側にさらに499 bp伸びたものであることが示された。得られた約2.5 kb部分のCRTI遺伝子塩基配列を配列表の配列番号2に示す。

また、上記499 bp部分を含むCRTI遺伝子(R3)を導入した組換え体大腸菌(JM109)を平成8年6月12日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託(受託番号FERM P-15685)し、平成8年9月9日に国際寄託に移管した(受託番号FERM BP-5660)。

また、上記得られた499 bpのうち1位から372位までのDNAをプロー

ブとして用いて実施例3に記載されている方法に従い、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラフィーでは、フィルムにはコダック社のXARフィルム、スクリーンにはデュポン社のライトニングプラス(+)を用いて-80℃で24時間感光させた。ラット正常肝臓と肝癌のpoly A RNAを用いた系で、ラット肝臓癌に特異的な2.5bpのバンドの存在を確認した(図2(プローブB))。この結果は、上記得られた499bpのDNAに基づいて、肝臓癌の検出が可能であることが示された。

また得られたCRTIについて、データベースを用いてホモロジー検索をしたところ、ホモロジーがある配列としてTREB5(又はXBP)が検索され、本願発明のCRTIと約79%のホモロジーを有していた。TREB5は、The EMBO Journal vol.9, No.8, pp2537-2542(1990)にて報告されており、XBPは、Science vol.247, pp1581-1584(1990)にて報告されている。

(実施例5) CRTI蛋白質の発現

1. 組み換え大腸菌の作製

実施例2で取得したCRTI-B遺伝子をヒスチジンタグを導入したpET3aベクター(図3)に組み込んだ後、大腸菌BL21(DE3)pLysSに導入した。

2. CRTIの作製

(1) 1. で作製した大腸菌をアンピシリン100μg/mlを含むLB培地で培養し、分光光度計(ベックマン製)で測定した濁度が600nmの波長で0.5になった時点で、0.5mMになるようにIPTGを加えCRTI蛋白質の発現誘導を行った。

(2) 2時間後、大腸菌を回収し、Lysis Bufferに懸濁した後、ソニケーションし、Beckman Optima XL-80を使用し、50.2Tiローターで18000rpm、4℃。15分間遠心分離した。

(3) この後、沈殿物を6M塩酸グアニンに溶解し、Ni-アガロース（キアゲン製）を用いて、取扱い説明書の通りに精製した。

3. SDS-PAGE 電気泳動

精製された標品のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーで染色し、精製がうまく行われたことを確認した。

(実施例6) ヒト肝臓癌診断への可能性の検討

(1) ヒト肝臓癌組織及び同一患者の非癌部肝臓組織からそれぞれ全RNAを、『Current Protocols in Molecular Biology』のChapter 4に記載のSingle-step RNA isolation 法に従い調製した。試薬、操作環境等は同様に上述の文献に記載の条件に従った。

(2) (1) の肝臓癌および非癌部の全RNAを各々10 μ gずつを用いて『Current Protocols in Molecular Biology』（1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社）Chapter 4に記載されているホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動を用いる方法に従いノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。使用したプローブDNAは、実施例3で作製したものと同一のものを用いた。オートラジオグラフィーでは、フィルムにはコダック社のXARフィルム、スクリーンにはデュポン社のライトニングプラス（+）を用いて-80℃で24時間感光させた。

結果を図4に示す。検討の結果、ヒト肝臓癌においても癌部では非癌部に比べ有意な発現量の上昇がみられた。このことは、本CRTI遺伝子を用いることでヒト肝臓癌のモニタが可能であることを示している。

(実施例7) 抗CRTI抗体の作製

実施例5で作製したCRTI蛋白質を『Antibodies A Labo

ratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) chapter 5に記載の方法にしたがってウサギに免疫し、抗CRTI抗体を作製した。

2. ウェスタンブロット

『Current protocols in molecular biology』に記載の方法にしたがって行った。

(1) 実施例5で作製したCRTI蛋白質をウェスタンブロットを行った。

(2) その後、抗CRTI抗体を該CRTI蛋白質と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質(NBT、BCID(共にプロメガ製))と反応させ呈色させた。これより抗CRTI抗体がCRTIと反応することが確認された。

(実施例8) CRTIの肝癌の検出(診断)への利用の検討

(1) 実施例1で作製した各種肝癌組織1gを5mlの2xSDS sample bufferでホモジナイズした後、3分間ボイルすることで肝癌組織抽出液を得た。

(2) 該抽出液を12.5%SDS-PAGE電気泳動にかけた後、ウェスタンブロットを行った。なお、蛋白質量は、別に同様の電気泳動を行ったゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、比色することで揃えた。

(3) その後、実施例7で作製した抗CRTI抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質(NBT、BCID(共にプロメガ製))と反応させ呈色させた(図5)。この結果、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法の結果と同様に、肝癌及び肝癌発現過程で有意なCRTI蛋白質の増加が確認された。すなわち、該抗体は、肝癌と正常肝臓の識別および

発現過程の肝臓と正常肝臓の識別が可能であり、肝癌の早期診断等に使用できることが確認された。

(実施例9) CRTIのヒトの癌の検出(診断)への利用の検討

(1) 次の9種のヒトの各種癌細胞株を以下の培地で培養した。

①Li21(ヒト肝癌細胞株)②LiHM(ヒト肝癌細胞株)③LiNM(ヒト肝癌細胞株)④RERF(ヒト肺癌細胞株)⑤AZ(ヒト胃癌細胞株)⑥Hec1(ヒト子宮癌細胞株)⑦Alex(ヒト肝癌細胞株)⑧MEWO(ヒトメラノーマ)⑨PaCa(ヒト膵臓癌細胞株)④、⑤、⑥、⑧及び⑨についてはJCRB(Japanese Cancer Research Resource Bank)から分譲を受けた。これらの①ないし⑨の株については他の株でもよい。

①ないし③及び⑦は、RPMI1640に10%FCSを添加したものを培地に使用した。④ないし⑥、⑧及び⑨は、分譲時に推奨されている培地で培養した。

(2) (1)で培養し、シャーレ面積の80%程度まで増殖した各培養細胞をそれぞれ5mlの1xPBSで2回洗浄した後、10cmシャーレ1枚に対して1mlの2xSDSサンプルバッファーを加え、ラバーポリスマン(住友ベークライト製)で攪拌することによりホモジネートしたものを、エッペンドルフチューブに移した後、5分間 boil し、遠心分離にて不溶性のものを沈殿させた上清部分をサンプルとして下記の要領でウェスタンブロット解析を行った。

①先に調製したサンプルの5ないし15 μ lを10%SDS-PAGE電気泳動にかけた。蛋白質量は、予め同様の電気泳動を行ったゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、比色することにより量を求め、量を揃えたものを電気泳動に供した。

②その後、実施例7で作製した抗CRTI抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応さ

せ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質（NB T、BC I D（共にプロメ
ガ製））と反応させ呈色させた（図6）。この結果、肝癌を含む全ての癌発現過
程でC R T I 蛋白質の発現が確認された。すなわち、該抗体は、ヒトにおいて癌
細胞のC R T I の検出が可能であり、癌の診断等に使用できることが確認された。

また、実施例8の結果と合わせて、本抗体は、ヒト及びラットでクロスリアク
ションすることが分かった。

（実施例10）C R T I 遺伝子のラット組織間分布の確認

組織間分布の確認には、R a t M T N B l o t TM（クローンテック製）を
用いた。この製品は、上述のノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うた
めに市販されている、ラット各組織のp o l y A R N Aをブロットしたメンブ
ランである。このメンブランを『M o l e c u l a r C l o n i n g S e c
o n d E d i t i o n』（C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o
r a t o r y P r e s s、1989）p p 7. 3-7. 84に記載の方法、及
び製品取り扱い説明書に従い実施例3で作製したものと同様のC R T I 遺伝子プ
ローブを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。オートラジ
オグラフィーでは、フィルムにはコダック社のX A Rフィルム、スクリーンには
デュボン社のライトニングプラス（+）を用いて-80℃で24時間感光させた。

結果を図7に示す。結果から明らかなように、C R T I 遺伝子は調べた全臓器
で発現しており、その中でも特に肝臓、肺で強く発現している。

この結果と実施例3の結果から、各臓器においても該臓器が癌化すれば、C R
T I 遺伝子の発現が増加することが考えられ、C R T I 遺伝子により各臓器の癌
の発症及び進行程度のモニターが可能であると考えられる。

また、これより、各臓器からのC R T I 蛋白質の検出により、該臓器の癌の発
症及び進行程度のモニターが可能であると考えられる。

(実施例 11) CRTI 遺伝子のヒト組織間分布の確認

組織間分布の確認には、Human MTN Blot™ (クローンテック製) を用いた。この製品は、上述のノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うために市販されている、ヒト各組織の poly A RNA をブロットしたメンブランである。このメンブランを『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) pp 7. 3-7. 84 に記載の方法、及び製品取り扱い説明書に従い実施例 3 で作製したものと同様の CRTI 遺伝子プローブを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラフィーでは、フィルムにはコダック社の XAR フィルム、スクリーンにはデュボン社のライトニングプラス (+) を用いて -80℃ で 24 時間感光させた。

結果を図 8 に示す。結果から明らかなように、CRTI 遺伝子は調べた全臓器で発現しており、その中でも特に膵臓、肝臓で強く発現している。

この結果と実施例 6 の結果から、ヒトの各臓器においても該臓器が癌化すれば、CRTI 遺伝子の発現が増加することが考えられ、CRTI 遺伝子によりヒトの各臓器の癌の発症及び進行程度のモニターが可能であると考えられる。

また、これより、ヒトの各臓器からの CRTI 蛋白質の検出により、該臓器の癌の発症及び進行程度のモニターが可能であると考えられる。

以上の実験結果より、本発明の CRTI 又は CRTI 遺伝子を肝臓等の組織から検出することで肝癌等の該組織の癌の診断が可能となる。また、CRTI 遺伝子の一部又は全部を用いることで肝癌等の癌の発症を遺伝子の発現レベルで診断することが可能となる。また、抗 CRTI 抗体を用いることで、肝癌等の癌の発症を免疫組織学的に診断することが可能となる。さらに、将来的には該遺伝子や該抗体を用いた癌の治療への応用が期待される。

(実施例 12) 肝癌特異的な蛋白質 HRP I 及び GAD I I のアミノ酸配列及

び該蛋白質をコードする遺伝子の決定

I. H P R I、G A D I I

1. 遺伝子の大量調製

H R P I 遺伝子、G A D I I 遺伝子についてそれぞれ以下の操作を行い、遺伝子を大量調整した。

(1) 実施例1の11. (4) 又は(5) でN Z Y 寒天培地上に形成させたプラークから回収したλファージをSM溶液に懸濁した。

(2) (1) の懸濁液50 μ l とY1090 r -大腸菌20 μ l を混合し、37℃、15分間放置した。

(3) その後、100 μ g / m l アンピシリンを含む10 m l N Z Y 培地に(2) で混合した溶液を移し、37℃で6時間培養した。

(4) 8000 r p m、5分間遠心分離し、上清を回収した。

(5) 該上清に、5M N a C l を1 m l、ポリエチレングリコール6000を1.1 gを加え、溶かした。

(6) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000 r p m、4℃で20分間遠心分離を行った。

(7) 沈殿を回収し、700 μ l のSM溶液に懸濁した。

(8) クロロホルムを500 μ l 加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

(9) 5000 r p m、10分間遠心分離し、水層を回収した。

(10) これに、1 m g / m l R N a s e A、5 m g / m l D N a s e I (共にシグマ製) を各1 μ l ずつ加え、37℃で1時間放置したのち、20%ポリエチレングリコール6000 (0.8M N a C l) を600 μ l 加え、氷上に30分間放置した。

(11) 4℃で、15000 r p m、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

(12) この沈殿に500 μ l のSM溶液、50 μ l の5M N a C l、50

μ l の 0.5 M EDTA を加え、更に、400 μ l のフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かして cDNA を遊離させた。

(13) 該溶液を室温で 15000 rpm、5 分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に 1 ml のエタノールを加え、15000 rpm、20 分間遠心分離し、液層を捨てた。

(14) 70% エタノール 1 ml で沈殿を洗浄し、100 μ l の TE 溶液 (Tris-Cl pH 8.0 10 mM、1 mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA 溶液を得た。

2. HRP I 遺伝子のベクターへの挿入

HRP I 遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

(1) DNA 切断の系を以下のようにし、制限酵素 Not I (宝酒造製) による DNA 切断を行った。

DNA 溶液 (1. で調製したもの)	20 μ l
0.1% BSA	10 μ l
0.1% Triton X100	10 μ l
Not I (宝酒造製)	2 μ l
RNase A (日本ジーン製)	1 μ l
10xH buffer (Takara 製)	10 μ l
滅菌水	47 μ l
合計 100 μ l	

反応温度 37℃

反応時間 4 時間

(2) その後、0.7% NuSieve (登録商標) GTG アガロース (宝酒造製) 電気泳動を行い、1.6 kbp 付近の DNA を切り出し、この DNA を GENE CLEAN II (登録商標、フナコシ製) を用いて取扱説明書の通り

にDNAを回収した。

(3) DNAを組み込むpBluescript II (ストラタジーン製) に Not I で切断後脱リン酸化を行った。

①Not Iでの切断は、以下の系で行った。

pBluescript II (1 μ g/ μ l)	3 μ l
10xH buffer	2 μ l
0.1% BSA	2 μ l
0.1% Triton X100	2 μ l
Not I	2 μ l
滅菌水	10 μ l
合計	20 μ l

反応温度 37℃

反応時間一晩

②その後、2 μ l 1M Tris pH8.0を加え、1 μ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造製)を加え、65℃で1時間放置した。

③その後、フェノール/CHCl₃抽出を常法に従い2回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE溶液にて100 ng/ μ lに溶かした。

④2)で得られたDNAと、③で得られたpBluescript IIを、以下の系で反応させ、DNAをベクターに挿入した。

DNA ((2)で調製したもの)	5 μ l
pBluescript II Not I切断物 (③で調製したもの)	1 μ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン製)	2 μ l
T4リガーゼ (日本ジーン製)	1 μ l
滅菌水	11 μ l

合計 20 μ l反応温度 16 $^{\circ}$ C

反応 2 時間

3. GAD I I 遺伝子のベクターへの挿入

GAD I I 遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

(1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素E c o R I (宝酒造製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 μ l
E c o R I (宝酒造製)	2 μ l
R N a s e A (日本ジーン製)	1 μ l
10xH b u f f e r (宝酒造製)	10 μ l
滅菌水	67 μ l
合計	100 μ l

反応温度 37 $^{\circ}$ C

反応時間 4 時間

(2) その後、0.7% NuSieve (登録商標) GTGアガロース (宝酒造製) 電気泳動を行い、2.1 k b p 付近のDNAを切り出し、このDNAをG E N E C L E A N I I (登録商標、フナコシ製) を用いて取扱説明書の通りにDNAを回収した。

(3) DNAを組み込むp B l u e s c r i p t I I (ストラタジーン製) にE c o R I で切断後脱リン酸化を行った。

①E c o R I での切断は、以下の系で行った。

p B l u e s c r i p t I I (1 μ g / μ l)	3 μ l
10xH b u f f e r	2 μ l

EcoRI	2 μ l
滅菌水	14 μ l
合計	20 μ l

反応温度 37℃

反応時間 一晚

②その後、2 μ l 1M Tris pH8.0を加え、1 μ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造製)を加え、65℃で1時間放置した。

③その後、フェノール/CHCl₃抽出を常法に従い2回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE溶液にて100 μ g/ μ lに溶かした。

④2) で得られたDNAと、③で得られたpBluescript IIを、以下の系で反応させ、DNAをベクターに挿入した。

DNA ((2) で調製したもの)	5 μ l
pBluescript II EcoRI切断物 (③で調製したもの)	1 μ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン製)	2 μ l
T4リガーゼ (日本ジーン製)	1 μ l
滅菌水	11 μ l
合計	20 μ l

反応温度 16℃

反応 2時間

4. 遺伝子の大腸菌への導入

2. で作製したHRPIを挿入したベクター及び3. で作製したGADIIを挿入したベクターを、それぞれ常法に従い反応液を全て、E. coli JM10

9 コンピテントセル（宝酒造製）に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900 μ lを加え、37℃、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

なお、このHRPI遺伝子を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託（受託番号FERM P-15164）、平成8年9月11日国際寄託に移管した（受託番号 FERM BP-5663）。また、GADII遺伝子を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託（受託番号FERM P-15165）し、平成8年9月11日国際寄託に移管した（受託番号 FERM BP-5664）。

5. 遺伝子の塩基配列の決定

(1) 4. で回収したE. coli JM109をLB寒天培地（100 μ g/mlアンピシリン、0.1mM IPTG、0.004%X-gal含有）に撒き、37℃で16時間培養した。

(2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを2ml LB培地（100 μ g/mlアンピシリン含有）に植え、37℃で16時間培養した

(3) その後、12000rpm、1分間遠心分離して集菌し、Magic Miniprep（登録商標、プロメガ製）に従いプラスミドDNA溶液を回収した。

(4) 回収したDNAをT7シーケンシングキット（ファルマシア製）に従い、シーケンスし、全塩基配列を決定した。HRPI遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号4に、GADII遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号6に示す。得られたGADII遺伝子配列に関して、データベースを用いてホモロジー検索

をしたところ、一部においてホモロジーがある配列としてCSAD遺伝子が検索された。CSAD遺伝子は、Biochemica et Biophysica Acta vol.1262, pp79-82(1995)に報告されている。

6. アミノ酸配列の決定

5. で決定した塩基配列から、HRPI及びGADIIそれぞれのアミノ酸配列を決定した。HRPIのアミノ酸配列を配列表の配列番号3に、GADIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に示す。

II. ヒトGADII

1. 完全長遺伝子の単離

完全長遺伝子の単離は『Molecular Cloning Second Edition』Chapter 2に記載の方法に準じて行った。以下にその概要を示す。

(1) cDNAライブラリーはCLONTECH社のHuman Liver 5'-Stretch plus cDNAライブラリーを使用した。このcDNAライブラリーをC600-大腸菌に接触させた後、0.7%寒天を含むNZY培地に混合し、1.5%寒天を含むNZY培地プレートに撒いた。42℃で6時間培養を行うことでcDNAを大量に含むプラークを形成させた後、このプレート上にニトロセルロースフィルター（イモビロン（登録商標、ミリポア製））を載せ、形成されたプラークを転写した。

(2) このフィルターを水酸化ナトリウムでプラーク中のcDNAを変性させた。変性の条件は実施例1の7. (1)に記載の条件と同じで行った。

(3) 変性させたcDNAを75℃で2時間熱処理して固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションに用いたプローブには、II. で塩基配列を決定したラットGADII遺伝子のうち配列表の配列番号4の65

番目のAから611番目のGまでをランダムラベリング（ベーリンガー・マンハイム製のランダムラベリングキットを使用した）で ^{32}P -dCTP標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献に記載の条件にしたがった。

（4）ハイブリダイゼーションの結果、フィルターに固定したcDNAから得られたポジティブシグナルに対応するプラークから完全長のヒトGADII遺伝子を得た。

2. ヒトGADII遺伝子の塩基配列及びヒトGADIIのアミノ酸配列の決定

ヒトGADII遺伝子の塩基配列の決定はI.と同様の方法で行った。すなわち、以下のようにして行った。

（1）遺伝子の大量調製

1) 1. (1)でNZY寒天培地上に形成させたプラークから回収したλファージをSM溶液に懸濁した。

2) 1)の懸濁液50 μl とC600-大腸菌20 μl を混合し、37℃、15分間放置した。

3) その後、10ml NZY培地に2)で混合した溶液を移し、37℃で6時間培養した。

4) 8000rpm、5分間遠心分離し、上清を回収した。

5) 該上清に、5M NaClを1ml、ポリエチレングリコール6000を1.1gを加え、溶かした。

6) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000rpm、4℃で20分間遠心分離を行った。

7) 沈殿を回収し、700 μl のSM溶液に懸濁した。

8) クロロホルムを500 μl 加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

9) 5000rpm、10分間遠心分離し、水層を回収した。

10) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I (共にシグマ社製) を各1 μ lずつ加え、37℃で1時間放置したのち、20% ポリエチレングリコール6000 (0.8M NaCl) を600 μ l加え、氷上に30分間放置した。

11) 4℃で、15000rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

12) この沈殿に500 μ lのSM溶液、50 μ lの5M NaCl、50 μ lの0.5M EDTAを加え、更に、400 μ lのフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

13) 該溶液を室温で15000rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に1mlのエタノールを加え、15000rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

14) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100 μ lのTE溶液 (Tris-Cl pH8.0 10mM、1mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

(2) ヒトGAD II 遺伝子のベクターへの挿入

ヒトGAD II 遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 μ l
EcoRI (宝酒造社製)	2 μ l
RNase A (日本ジーン社製)	1 μ l
10xH buffer (宝酒造社製)	10 μ l
滅菌水	67 μ l
合計	100 μ l



反応温度 37℃

反応時間 4 時間

2) その後、0.7% NuSieve (登録商標) GTG アガロース (宝酒造社製) 電気泳動を行い、2.1 kbp 付近の DNA を切り出し、この DNA を GENE CLEAN II (登録商標、フナコシ社製) を用いて取扱説明書の通りに DNA を回収した。

3) DNA を組み込む pBluescript II (ストラタジーン社製) に EcoRI で切断後脱リン酸化を行った。

① EcoRI での切断は、以下の系で行った。

pBluescript II (1 μg / μl)	3 μl
10xH buffer	2 μl
EcoRI	2 μl
滅菌水	14 μl
合計	20 μl

反応温度 37℃

反応時間 一晚

② その後、2 μl 1M Tris pH8.0 を加え、1 μl Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) を加え、65℃ で 1 時間放置した。

③ その後、フェノール / CHCl₃ 抽出を常法に従い 2 回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE 溶液にて 100 μg / μl に溶かした。

④ 2) で得られた DNA と、③ で得られた pBluescript II を、以下の系で反応させ、DNA をベクターに挿入した。

DNA ((2) で調製したもの) 5 μl

pBluescript II EcoRI切断物 (③で調製したもの)	1 μ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン社製)	2 μ l
T4リガーゼ (日本ジーン社製)	1 μ l
滅菌水	11 μ l
合計	20 μ l

反応温度 16℃

反応 2時間

(3) 遺伝子の大腸菌への導入

(2) で作製したヒトGADIIを挿入したベクターを、それぞれ常法に従い反応液を全て、E. coli JM109コンピテントセル (宝酒造社製) に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900 μ lを加え、37℃、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

なお、このヒトGADII遺伝子を導入した組み換え体大腸菌をhCSAD2と名付け通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に寄託 (受託番号FERM P-15762) し、平成8年9月4日国際寄託に移管した (受託番号 FERM BP-5653)。

(4) 遺伝子の塩基配列の決定

1) (3) で回収したE. coli JM109をLB寒天培地 (100 μ g /mlアンピシリン、0.1mMIPTG、0.004%X-gal含有) に撒き、37℃で16時間培養した。

2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを2ml LB培地 (100 μ g /mlアンピシリン含有) に植え、37℃で16時間培養した

3) その後、12000rpm、1分間遠心分離して集菌し、Magic

Miniprep（登録商標、プロメガ製）に従いプラスミドDNA溶液を回収した。

4) 回収したDNAをDNAシーケンシングキット（ダイターミネーター法、パーキンエルマー社製）を用いてその取扱説明書に従い、シーケンスし、全塩基配列を決定した。塩基配列を配列表の配列番号8に示す。なお、ラットGAD I I 遺伝子とのホモロジー（ラットに対するヒトのホモロジー）は、遺伝子全長で73%、蛋白質コード部分で83%である。ホモロジー計算は、DINA SIS ver 3.0（日立ソフトウェアエンジニアリング社製）のマキシマムマッチングを用いて行った。

（5）アミノ酸配列の決定

（4）で決定した塩基配列から、ヒトGAD I I のアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列を配列表の配列番号7に示す。ラットGAD I I とのホモロジー（ラットに対するヒトのホモロジー）は85%である。

（実施例13）肝癌の遺伝子発現レベルでの診断の可能性の確認

1. HRP I 遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析
HRP I 遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を、『Current Protocols in Molecular Biology』（1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社）Chapter 4に記載されているホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動を用いる方法に従って行った。用いたpoly A RNAの量は、各サンプルにつき500ngで、①正常肝臓及びDEN投与後7カ月の肝癌のpoly A RNAを用いたもの、②1. で調製した肝癌飼料の全てのpoly A RNAを用いたものの2種類について行った。

(1) 実施例12のI. 2. でpBlue script II上にのせたHRPI遺伝子を制限酵素処理にて、ベクターから切り出した。

(2) その後、制限酵素処理液をアガロースゲル電気泳動にかけて、目的とするHRPI遺伝子を分離した。

(3) (2) で分離したHRPI遺伝子をGENE CLONE II (登録商標、フナコシ製) を用いて精製した。

(4) 精製したHRPI遺伝子をランダムプライムドDNAラベリングキット (ペーリンガー・マンハイム製) を用いて製品取扱説明書に従い、 α -P32-dCTP (アマシャム製) を用いて 32 P-dCTP標識したHRPI遺伝子プローブを作製した。

(5) (4) で作製したプローブを用いて、まず正常肝臓と7カ月肝癌を用いた系において、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。この結果、肝癌で有意に増加する遺伝子としてHRPI遺伝子が検出された。これよりHRPI遺伝子を用いることで、肝癌と正常肝臓の識別が可能となること、すなわち、肝癌の発症のモニターが可能となること、さらには肝癌の診断が可能であることが判明した。

(6) 次に、同じプローブを用いて、1. で調製した肝癌飼料全てのpolyA RNAを用いたものを使用した系でノーザンブロットハイブリダイゼーション法解析を行ったところ、発癌誘導に伴いHRPI遺伝子の有意な増加が見られることが判明した (図9)。このことから、HRPI遺伝子を用いて発癌初期の肝癌の識別も可能であること、すなわち肝癌の進行程度のモニターが可能であること、さらには肝癌の早期診断が可能であることが判明した。

2. GADII遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析

同様の方法でGAD I I 遺伝子についてもノーザンブロットハイブリダイゼーション法解析を行った。結果を図10に示す。これより、GAD I I 遺伝子を用いることで肝癌と正常肝臓の識別が可能となること、及び発癌初期の肝癌の識別も可能であること、すなわち肝癌の進行程度のモニターが可能となること、さらには肝癌の早期診断が可能であることが判明した。

(実施例14) HRP I 部分蛋白質の発現

1. 組み換え大腸菌の作製

実施例1の8で取得したHRP I 遺伝子の部分長クローン(185-299番目のアミノ酸をコードする部分)をヒスチジンタグを導入したpET3aベクター(図3)に組み込んだ後、大腸菌BL21(DE3) pLys Sに導入した。

2. HRP I の作製

(1) 1. で作製した大腸菌をアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地で培養し、分光光度計(ベックマン製)で測定した濁度が 600nm の波長で0.5になった時点で、0.5mMになるようにIPTGを加えHRP I 蛋白質の発現誘導を行った。

(2) 2時間後、大腸菌を回収し、Lysis Bufferに懸濁した後、ソニケーションし、Beckman Optima XL-80を使用し、50.2Tiローターで 18000rpm 、 4°C 。15分間遠心分離した。

(3) この後、沈殿物を6M塩酸グアニンに溶解し、Ni-アガロース(キアゲン製)を用いて、取扱い説明書の通りに精製した。

3. SDS-PAGE電気泳動

精製された標品のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、クマシーブリアントブルーで染色し、精製がうまく行われたことを確認した。結果を図11に示す。

(実施例15) HRP I 全長蛋白質の発現

1. HRP I 遺伝子の大量調整

(1) 組み換えベクターの作製

HRP I 遺伝子を図12に示されるヒスチジンタグを導入した pBlueBac111 ベクター (インビトロゲン製) に組み込んだ。以下にその詳細を記す。

1) まず、実施例12の2. で作製した HRP I 遺伝子を挿入した pBlue script II ベクターを、PCR法 (『Current protocols in molecular biology』 (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 15 に記載) により、次の式 (1) 及び式 (2) の塩基配列のプライマーを用いて、HRP I 遺伝子の第一メチオニン部分をコードする塩基配列を Nde I 認識部位として増幅した。

5' GAA TTC CAT ATG TTC TAT ATA CAG AG
T TCT GAG GC 3' . . . 式 (1)

5' TCC AGT TAG TGA CGT CTG ATG 3'
. . . 式 (2)

2) 増幅された遺伝子を Nde I 及び BamHI (共に宝酒造製) でカタログの条件通りに切断した。

3) 別に、実施例12の1. の2. で作製した pBlue script II 上の HRP I 遺伝子を BamHI 及び SacI (共に宝酒造製) でカタログの条件通りに切断した。各々の切断された遺伝子は、アガロース電気泳動及び GENE CLEAN II (登録商標、フナコシ製) を用いて目的部分のみを精製した。

4) 2) 及び 3) でそれぞれ作製した遺伝子を Ligation Pack (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結した。

5) EcoRI/NdeI/EcoRI アダプター (5' AATTCCATA TGG 3') を DNA 合成機で合成し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒

造製)を用いて説明書にしたがいリン酸化した。

6) Bluescript IIをEcoRIで切断し、5)で作製したEcoRI/NdeI/EcoRIアダプターを切断部位に組み込んだ。

7) 6)で作製したベクターのNdeI、SacIを切断し、4)で作製した遺伝子を該部位に組み込んだ。

8) 該ベクターを大腸菌JM109に常法に従い導入し、該ベクターが挿入された大腸菌を、LB培地(アンピシリン100 μ g/ml含有)で培養した。

9) 培養した大腸菌から、Magic Miniprep(プロメガ製、登録商標)を製品説明書に従って用いて、目的のベクターを精製した。

10) 該ベクターをNdeIで切断後、Ligation Packを使用し、NdeI/NcoIリンカー(5' TATCCATGG 3')と連結し、ベクターの両切端をNcoIとした。

11) 該ベクターのHRPI遺伝子部分のNcoIサイトを制限酵素で切断し、両端がNcoIであるHRPI遺伝子を作製した。

12) これを常法によりアガロース電気泳動後、GENE CLEAN IIを用いて目的部分のみを精製した。

13) 図12に示すヒスチジンタグを導入したpBlueBacIIIベクター(インビトロゲン製)を常法によってNcoIで切断した後、脱リン酸化処理を行った。

14) 10)で精製したHRPI遺伝子と11)で作製したベクターとを、Ligation Pack(日本ジーン製)を用いてその取扱説明書に従い連結した。

なお、上記各過程でのベクター又は大腸菌に組み込まれた遺伝子の確認は、挿入断片の塩基配列を読み取って行った。

(2) HRPI遺伝子の大量調整

HRPI 遺伝子を組み込んだプラスミドを『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989) chapter 1 に記載の方法で大量調製した。なお、プラスミドの精製には同書記載の超遠心分離を用いたが、その回数は3回行った。

2. HRPI 全長蛋白質の発現

(1) 大量調製したプラスミドをリポフェクション法 (DO TAP (登録商標、ベーリンガー・マンハイム製)) によって Sf9 細胞に導入した。

(2) 得られた組み換え体ウィルスを再び Sf9 細胞に感染させ、大量発現させた。リポフェクション後の Sf9 細胞の扱いや、組み換え体ウィルスの作製、蛋白質の大量発現等の方法は、すべて MAXBAC (登録商標、インビトロゲン製) の製品説明書に従い行った。

(3) HRPI を発現させた Sf9 細胞は SDS sample buffer に懸濁させ、5 分間ボイルした後、SDS-PAGE 電気泳動にかけた。その後、クマシーブリリアントブルーで染色した結果、HRPI のバンドが検出された。図 13 に、SDS-PAGE 電気泳動の結果を示す。

(実施例 16) GADII の発現

1. GADII 遺伝子の大量調整

(1) 組み換えベクターの作製

ラット GADII 遺伝子を図 3 に示されるヒスチジンタグを導入した pET3a ベクターに組み込んだ。以下にその詳細を記す。

① まず、実施例 12 の 1. の 3. で作製した GADII 遺伝子を挿入した pBluescript II ベクターを、PCR 法 (『Current protocols in molecular biology』(Greene Pu

blishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 15に記載) により、次の式 (3) 及び式 (4) の塩基配列のプライマーを用いて、GADII 遺伝子の第一メチオニン部分をコードする塩基配列の前にEcoRIサイトを導入して増幅した。

5' GAA TTC CCC ATG GCT GAC TCA AAA CC
A CTC AGA A 3' . . . 式 (3)

5' GCA CTG ACC AGA AAT GGC AC 3'
. . . 式 (4)

②増幅された遺伝子をEcoRI, SacIで切断して切り出した。

③別に、GADII遺伝子を挿入したpBluescriptIIのGADII遺伝子のC末端側に存在する残りの部分をBglIIで切断した。その後、クレンーフラグメントで平滑化した後、SacIで切断して遺伝子を切り出した。

④②で切り出した遺伝子と③で切り出した遺伝子とをLigation Pack (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結し、GADII遺伝子を作製した。

⑤図3に示すヒスチジンタグを導入したpET3aベクターをEcoRI, SmaIで切断した後、脱リン酸化処理を行った。

⑥④で作製したGADII遺伝子と⑤で作製されたベクターとを、Ligation Pack (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結した。

なお、上記過程でのベクターに挿入された遺伝子の確認は、挿入断片の塩基配列を読み取って行った。

(2) GADII 遺伝子の大量調整

GADII遺伝子を組み込んだプラスミドを『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) chapter 1に記載の方法で大量調製した。

2. GAD I I の発現

(1) 大量調製したプラスミドを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S に導入した。

(2) 該大腸菌をアンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む L B 培地で培養し、分光光度計 (ベックマン製) で濁度が 600 nm の波長で 0.5 になった時点で I P T G を 0.5 mM になるように加え、GAD I I の発現誘導を行った。

3. GAD I I の精製

(1) 2 時間後、大腸菌を回収し、L y s i s B u f f e r に懸濁した後 4°C でソニケーションし、B e c k m a n O p t i m a X L - 8 0 を使用し、 50.2 Ti ローターで 1800 rpm 、 4°C で 15 分間遠心分離した。

(2) その後、上清を取り、 1 M イミダゾール ($\text{pH } 7.5$) を終濃度 10 mM になるように加え、N i - アガロース (登録商標、キアゲン製) を用いて非変性条件で取扱い説明書の通りに精製した。

(3) 精製された標品を、 10% S D S - P A G E 電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーで染色したところ、 56 kD 付近にバンドが現れ (図 14)、得られた蛋白質が GAD I I 蛋白質であることが確認された。

(4) 次に残った精製 GAD I I 蛋白質を (3) と同様に $2 \times$ S D S サンプルバッファーで処理し、 5 mm ゲル厚の 10% S D S - P A G E 電気泳動にかけ、泳動終了後ゲルを 4°C にて 0.25 M の K C l で 30 分間染色を行った。

(5) 56 kD 付近の白く染色された目的のバンドをカッターナイフで切り出し、そのバンドをカッターナイフでさらに細かく刻んだ。

(6) バイオラッド社製のモデル 422 エレクトロエリユーターを用い、取扱い説明書に従い 20 mA で 8 時間、蛋白質の溶出を行った。

(7) 溶出された蛋白質を該エレクトロエリユーターの取扱説明書に従い回収した。蛋白質溶液の保存は -80°C にて行った。

(実施例 17) 抗HRPI抗体の作製

1. 抗HRPI抗体の作製

実施例 14 で作製したHRPI部分蛋白質を『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) chapter 5』に記載の方法にしたがってウサギに免疫し、抗HRPI抗体を作製した。

2. ウェスタンブロット

『Current protocols in molecular biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 1 に記載の方法にしたがって行った。

(1) 実施例 14 で作製したHRPI部分蛋白質及び実施例 15 で作製したHRPI完全長蛋白質をそれぞれウェスタンブロットを行った。

(2) その後、抗HRPI抗体を該HRPI部分蛋白質又はHRPI完全長蛋白質とそれぞれ反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質(NBT、BCID (共にプロメガ製))と反応させ呈色させた(図15 [A])。これより抗HRPI抗体がHRPIと反応することが確認された。なお、図15 [A]では、組み換え体HRPIがヒスチジンタグ分だけ分子量が大きくなっていることが見られる。

(実施例 18) HRPIの肝癌の診断への利用の検討

(1) 実施例 1 で作製した各種肝癌組織 1 g を 5 ml の 2 x SDS sample buffer でホモジナイズした後、3 分間ボイルすることで肝癌組織抽出液を得た。

(2) 該抽出液を12.5% SDS-PAGE 電気泳動にかけた後、ウェスタンブロットを行った。なお、蛋白質量は、別に同様の電気泳動を行ったゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、比色することで揃えた。

(3) その後、実施例17で作製した抗HRPI抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質(NBT、BCID(共にプロメガ製))と反応させ呈色させた(図15[B])。この結果、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法の結果と同様に、肝癌及び肝癌発現過程で有意なHRPI蛋白質の増加が確認された。すなわち、該抗体は、肝癌と正常肝臓の識別および発現過程の肝臓と正常肝臓の識別が可能であり、肝癌の発症のモニター、肝癌の早期診断等に使用できることが確認された。

(実施例19) 抗GADII抗体の作製

1. 抗GADII抗体の作製

実施例16で作製したGADII蛋白質を『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) chapter 5』に記載の方法にしたがってウサギに免疫し、抗HRPI抗体を作製した。

2. ウェスタンブロット

『Current protocols in molecular biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 1に記載の方法にしたがって行った。

(1) 実施例16で作製、精製したGADII蛋白質をナイロンメンブラン(イモビロンP(ミリポア製))上にウェスタンブロットを行った。

(2) その後、抗GADII抗体をメンブラン上のGADII蛋白質と反応さ

せた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギ Ig G 抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質 (NBT、BCID (共にプロメガ製)) と反応させ、呈色させた。56 kD に GAD II 蛋白質のバンドが検出され、これより抗 GAD II 抗体が GAD II 蛋白質と反応することが確認された。

(実施例 20) GAD II 蛋白質の肝癌の診断への利用の検討

(1) 実施例 1 で作製した肝癌組織 (DEN 投与後 7 ヶ月) 及び正常肝臓組織をそれぞれ 1 g を 5 ml の 2 x SDS sample buffer でホモジナイズした後、3 分間ボイルすることで肝癌組織抽出液を得た。

(2) 該抽出液、実施例 16 で作成した GAD II を 12.5% SDS-PAGE 電気泳動にかけた後、ウェスタンブロットを行った。なお、蛋白質量は、別に同様の電気泳動を行ったゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、比色することで揃えた。

(3) その後、実施例 19 で作製した抗 GAD II 抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギ Ig G 抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質 (NBT、BCID (共にプロメガ製)) と反応させ呈色させた。この結果、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法の結果と同様に、肝癌及び肝癌発現過程で有意な GAD II 蛋白質の増加が確認された。すなわち、該抗体は、肝癌と正常肝臓の識別および発現過程の肝臓と正常肝臓の識別が可能であり、肝癌の発症のモニター、肝癌の早期診断等に使用できることが確認された。

(実施例 21) HRP I 遺伝子、GAD II 遺伝子の組織間分布の確認

組織間分布の確認には、Rat MTN Blot (クローンテック製、登録商標) を用いた。この製品は、上述のノーザンブロットハイブリダイゼーション

を行うために市販されている、ラット各組織の poly A RNA をブロットしたメンブランである。このメンブランを『Molecular Cloning Second Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989）pp 7. 3-7. 84 に記載の方法、及び製品取り扱い説明書に従い前述の HRP I 遺伝子プローブ及び GAD I I 遺伝子プローブを用いてそれぞれノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

HRP I 遺伝子プローブの結果を図 16 に、GAD I I 遺伝子プローブの結果を図 17 に示す。結果から明らかなように、HRP I 遺伝子は肝臓及び腎臓で強く発現していて、他に肺でも発現している。また、GAD I I 遺伝子は肝臓、腎臓で強く発現していて、長さは異なるが肺でも発現している。

本発明の HRP I 又は HRP I 遺伝子もしくは GAD I I 又は GAD I I 遺伝子を肝臓から検出することで肝臓の進行程度のモニター、肝臓の診断、特に早期肝臓の診断が可能となる。

また、HRP I 遺伝子又は GAD I I 遺伝子それぞれの一部又は全部を用いることで肝臓の発症を遺伝子の発現レベルで診断することが可能となる。

また、抗 HRP I 抗体又は抗 GAD I I 抗体を用いることで、肝臓の発症を免疫組織学的に診断することが可能となる。

さらに、将来的には該遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子や該抗体を用いた肝臓癌治療への応用が期待される。

【配列表】

配列番号： 1

配列の長さ： 2 6 7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Lys
1				5				10						15	
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Gly	Gly	Arg	Ala	Leu	Pro
				20				25						30	
Leu	Met	Val	Pro	Gly	Pro	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr
				35				40						45	
Pro	Gln	Ala	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu
				50				55						60	
Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Lys	Leu	Lys	Asn	Arg	Val	Ala	Ala	Gln	Thr	Ala
				65				70						75	
Arg	Asp	Arg	Lys	Lys	Ala	Arg	Met	Ser	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	Val	Val
				85				90						95	
Asp	Leu	Glu	Glu	Glu	Asn	Gln	Lys	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Gln	Leu	Leu
				100				105						110	
Arg	Glu	Lys	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ile	Glu	Asn	Gln	Glu	Leu	Arg	Thr
				115				120						125	
Arg	Leu	Gly	Met	Asn	Ala	Leu	Val	Thr	Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Ala	Glu
				130				135						140	

Ser Lys Gly Asn Gly Val Arg Leu Val Ala Gly Ser Ala Glu Ser Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Arg Leu Arg Ala Pro Leu Gln Gln Val Gln Ala Gln Leu Ser
 165 170 175
 Pro Pro Gln Asn Ile Phe Pro Trp Ile Leu Thr Leu Leu Pro Leu Gln
 180 185 190
 Ile Leu Ser Leu Ile Ser Phe Trp Ala Phe Trp Thr Ser Trp Thr Leu
 195 200 205
 Ser Cys Phe Ser Asn Val Leu Pro Gln Ser Leu Leu Ile Trp Arg Asn
 210 215 220
 Ser Gln Arg Ser Thr Gln Lys Asp Leu Val Pro Tyr Gln Pro Pro Phe
 225 230 235 240
 Leu Cys Gln Trp Gly Pro His Gln Pro Ser Trp Lys Pro Leu Met Asn
 245 250 255
 Ser Phe Val Leu Thr Met Tyr Thr Pro Ser Leu
 260 265

配列番号： 2

配列の長さ： 2 5 2 0

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA t o mRNA

配列

CTCATTTCTT AAACACTCAT TTTGTGAAAT TCCCCAGGTC TGTGTGTATG TGTTTCGCTAA 60
 CTCTAAACCG GATATGCCAC CAGTTTGATT TTCGGCTGTA CTAGGGACCG ATGTGGCGCC 120

GGACATTATA ACGTGGTCGG GCTATGGTAA CGATCTGTGA GACTCGGTTT GGAAATCTGG 180
CCTGAGAGGA AAGCCTGGCA TTCCGGGTAA AAGTCTCAGC TGTGTGGGGA CGCGTCTGCC 240
GAGGACCCTG GACCCTGGAC TTCAGCAACC GGCTGTCTCT ACCGTCCACC CACCCTAAGG 300
CCCAGCTCGC ACGGCGAACA GCTGGGCAGC CACGCTGGAC ACTCACCCCG CCCGCGTTGA 360
GCCCCCCCC GGGCCTGCAG GACCAATAAA CGATGAATAC AGCCGCGCGT CACGCAAGCA 420
CAGGCCAATT CGCAGACGGG CACGACCCTA GAAAGGCTGG GCGCGGCAGG CGGCCACGGG 480
GCGGTGGCGG CGCTGGCGTA GACGTTTCCT GGCT 514
ATG GTG GTG GTG GCA GCG GCG CCG AGC GCG GCC TCG GCG GCC CCC AAA 562
GTG CTA CTC CTA TCT GGT CAG CCC GCC TCC GGC GGC CGA GCG CTG CCG 610
CTC ATG GTT CCG GGC CCG CGA GCC GCA GGG TCG GAG GCG AGC GGG ACA 658
CCG CAG GCT CGC AAG CGG CAG CGC CTC ACG CAC CTG AGC CCG GAG GAG 706
AAA GCG CTG CGG AGG AAA CTG AAA AAC AGA GTA GCA GCA CAG ACT GCG 754
CGA GAT AGA AAG AAA GCC CGG ATG AGC GAG CTG GAG CAG CAA GTG GTG 802
GAT TTG GAA GAA GAG AAC CAG AAA CTC CAG CTA GAA AAT CAG CTT TTA 850
CGA GAG AAA ACT CAT GGG CTT GTG ATT GAG AAC CAG GAG TTA AGG ACA 898
CGC TTG GGG ATG AAT GCC CTG GTT ACT GAA GAG GTC TCA GAG GCA GAG 946
TCC AAG GGG AAT GGA GTA AGG CTG GTG GCC GGG TCT GCT GAG TCC GCA 994
GCA CTC AGA CTA CGT GCG CCT CTG CAG CAG GTG CAG GCC CAG TTG TCA 1042
CCT CCC CAG AAC ATC TTC CCA TGG ATT CTG ACG CTG TTG CCT CTT CAG 1090
ATT CTG AGT CTG ATA TCC TTT TGG GCA TTC TGG ACA AGT TGG ACC CTG 1138
TCA TGT TTT TCA AAT GTC CTT CCC CAG AGT CTG CTA ATC TGG AGG AAC 1186
TCC CAG AGG TCT ACC CAG AAG GAC CTA GTT CCT TAC CAG CCT CCC TTT 1234
CTC TGT CAG TGG GGA CCT CAT CAG CCA AGC TGG AAG CCA TTA ATG AAC 1282
TCA TTC GTT TTG ACC ATG TAT ACA CCA AGC CTC TAG 1318
TCTTAGAGAT CCCCTCTGAG ACAGAGAGCC AACTAATGT GGTAGTGAAA ATTGAGGAAG 1378
CACCTCTAAG CTCTTCAGAA GAGGATCACC CTGAATTCAT TGTCTCAGTG AAGAAAGAAC 1438

CTTTGGATGA TGACTTCATT CCCGAGCTGG GCATCTCAAA CCTGCTTTCA TCCAGCCATT 1498
GTCTGAGACC ACCTTCCTGC CTGCTGGATG CTCACAGTGA CTGTGGATAT GAGGGCTCCC 1558
CTTCTCCCTT CAGCGACATG TCTTCTCCAC TTGGTACAGA CCACTCCTGG GAGGACACTT 1618
TTGCCAACGA ACTTTTCCCC CAGCTGATTA GTGTCTAAAG CCACCCACCA CTGGGCTCCT 1678
TCCCTGATCA TCACACTGCC TAGAGGATAG CATAGGCCTG TCTGCTTCAC TAAAAGCCAA 1738
AGTAGAGGCT ATCTGGCCTT ATAAGAATTC CTCTAAAGTA TTTCAAACCT CTTAGATGAC 1798
TTCCAAGTAT TGTCTTTTGA CACTCAGCTG TCTGAGGTCT TCAAAGGTAT TCCAATACTA 1858
CAGCTTTTGA GATTCTCATT ATCTTAAAGG TGGTAGCATG CTCTAAATCA TAGGGAAAGT 1918
CATCTGACAG TTATCGTTCA GCCTGGCTAT GTAGCCGAGG CTAAGCTGAA ACTTGTGACC 1978
CTCTTGACCC CACTCCCAAG TGCTGGACTT TACCAGGTGT GCAGCTCCAC ACCGGCCTCT 2038
TCACATGTCC TGAAGTAGAC ATGAGAGTCA CCAGTTCTTT CTCTCCTCCC CGCCCCACAG 2098
GTTTCTTTTG TTTCTTCTA CAAGCAGAGA AACAGCAACC TGAGGGGCCT GTCCTTCCTT 2158
ATGTCCAGTT CAAGTGAAGA TCAAGAATCT TTGTAAAATT ATTGGAAATT TACTGTGTAA 2218
ATGCTTGATG GAATCTTCTT GCTAGTGTAG CTTCTAGAAG GTGCTTTCTC CATTATTFTA 2278
AAACTACCCA TGCAATTAAA AAAGCAACGC AGCATCCCCG TTGAATGATT TTAGGGCTGT 2338
TTATCTTTAT CGTTTGCTAG GGGAGTAATT TCTCATCTAA AGTGAGCACA CCACTTTTTT 2398
AAAAGTCAGA GAGCGGGCTG GGGATTTAGC TCAGTGGTAG AGCGCTTACC TAGGAAGCGC 2458
AAGGCCCTGG GTTCGGTCCC CAGCTCCGGA AAAAAAAGAA CCAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2518
AA 2520

配列番号： 3

配列の長さ： 3 0 0

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 蛋白質

配列

Met	Phe	Tyr	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Ala	Leu	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn	Ser
1				5						10				15	
Leu	Arg	Lys	His	Leu	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Val	Tyr	Gly	Thr	Val	Phe
				20				25					30		
His	Met	Asn	Gln	Gly	Asn	Pro	Phe	Lys	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Asp	Lys
		35					40						45		
Trp	Pro	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Val	Ile	Arg	Pro	Gln	Glu	Gln	Asp	Met
	50					55						60			
Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	His	Tyr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Lys
65					70					75				80	
Asp	Pro	Lys	His	Cys	Gln	Glu	Phe	Leu	Gly	Ser	Ser	Asp	Val	Thr	Asn
				85					90					95	
Trp	Lys	Gln	His	Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Ser	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Lys
		100						105						110	
Val	Ile	Glu	Asn	Leu	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Lys	Val	Lys	His	Lys
		115						120						125	
Gln	Cys	Phe	Leu	Tyr	Met	Val	Ser	His	Thr	Ala	Lys	Lys	Leu	Thr	Pro
		130						135					140		
Ser	Leu	Val	Asp	Ala	Lys	His	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	Thr
145					150					155				160	
Pro	Phe	Asp	His	Gln	Leu	Phe	Lys	Phe	Ala	Arg	Leu	Asp	Val	Lys	His
				165						170				175	
Ala	Ala	Leu	Val	Asn	Ser	Ile	Trp	Tyr	Phe	Gly	Gly	Asn	Glu	Lys	Ser
			180							185				190	
Gln	Lys	Phe	Ile	Glu	Arg	Cys	Ile	Phe	Thr	Ser	Pro	Ser	Val	Cys	Ile
		195								200				205	

Met Gly Pro Glu Gly Thr Pro Val Ser Trp Ala Leu Met Asp His Thr
 210 215 220
 Gly Glu Leu Arg Met Ala Gly Thr Leu Pro Lys Tyr Arg His Gln Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Tyr His Val Ala Phe His Gln Val His Thr Leu Glu Lys Leu
 245 250 255
 Gly Phe Pro Met Tyr Leu His Val Asp Lys Val Asn Leu Thr Ile Gln
 260 265 270
 Arg Met Ser Ala Val Leu Gly Met Ser Pro Cys Pro Val Pro Gly Thr
 275 280 285
 Ser Gly Thr Gly Tyr Leu Ser Lys Ala Arg Lys Glu
 290 295 300

配列番号： 4

配列の長さ： 1 6 3 4

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA to mRNA

配列

ACAGATTTAT AGGTATTAGA AGAG ATG TTC TAT ATA CAG AGT TCT GAG GCA CTG 54
 CAG ATT CTG AAG AAT TCC CTA AGG AAG CAC CTC CCT GAG TCC TTA AAG 102
 GTT TAT GGG ACT GTC TTC CAC ATG AAC CAG GGA AAC CCA TTC AAG CTC 150
 AAG GCT GTG GTG GAC AAG TGG CCT GAT TTT AAT ACT GTT GTT ATT CGA 198
 CCA CAG GAA CAG GAC ATG ACA GAT GAC CTT GAC CAC TAC AAC AAC ACT 246
 TAC CTA ATT TAT TCC AAG GAT CCC AAG CAC TGT CAG GAA TTC CTT GGC 294

TCA TCA GAC GTC ACT AAC TGG AAA CAA CAT TTG CAG ATC CAA AGT TCA	342
CAG TCA GAC CTG GGC AAA GTG ATA GAA AAC CTT GGA GCC ACT AGC TTG	390
GGC AAG GTC AAG CAT AAG CAG TGC TTT CTC TAT ATG GTA TCT CAT ACA	438
GCA AAG AAA CTG ACT CCT TCC TTG GTG GAT GCA AAG CAC TTA GTA GTC	486
AGC AGT GAG AAA CCC ACA CCT TTT GAC CAT CAG TTA TTC AAA TTT GCC	534
CGC CTG GAT GTT AAG CAT GCT GCA TTG GTG AAT AGC ATC TGG TAT TTT	582
GGT GGC AAT GAG AAA AGC CAG AAG TTC ATT GAA CGC TGT ATC TTT ACC	630
TCT CCC AGC GTC TGT ATT ATG GGC CCT GAG GGG ACC CCT GTG TCC TGG	678
GCC CTG ATG GAT CAC ACT GGA GAA CTA AGA ATG GCA GGC ACC TTG CCT	726
AAG TAC CGG CAC CAG AAC CTC ATT TAC CAT GTT GCT TTT CAC CAG GTC	774
CAT ACA CTA GAG AAG CTG GGC TTT CCC ATG TAT TTA CAT GTG GAT AAG	822
GTT AAC CTC ACC ATT CAG AGA ATG TCT GCT GTG CTG GGC ATG TCC CCA	870
TGC CCT GTA CCT GGA ACC AGT GGA ACT GGG TAC CTC TCT AAA GCC AGA	918
AAA GAG TGA GAGGGGGACT GCACTTG TAG ATGGAGAAAT GGCTGAGTGA ACAGAGAGAA	977
GTGAACTGTC ATTAGGGTGG TGTGTGTTTC TAGAGAGCAG GGTGTCATCA CACTGAGCTG	1037
CACACAGTTT CTCGCCCTC ACATTGCTCA TGCTCTTAAT TCCATTTCTC AGCATACAGA	1097
AGGCCACCAT GTCCTGCTCC CACATTCTCA GGATTCCTGT AACACATTG GCTAAATTGT	1157
ACTCTCTCCT ATTCATTTTG CAGGCTCATT GATCCATGGC TATTAGTCAG TAGGTTTGT	1217
TTGTGACCTG ACCCCCCACA ACCCTGCACA CAGGCATACT TCCTCTGGCT TTCTGTAGCT	1277
TTGCTTTTAT GGGTTGGAGA AGTTTGTCT CATGTCACCTC ACCAGACATT AAATTGTAA	1337
TATGTAAAAA CTA CTACTATACA TGCAAACACA GATACACAGT ATGTGTGGTA CAACTGTAAG	1397
AATTGTTAGA AAAGAGACTA GAGCTCAGCA AGTAAATGTG CCTGCAGTCA AGCCTGGTAA	1457
CCTGAATTTG ATTCCTGGGA ACCACATTGT AAAAGGAGAG AATCTATTCC ATCGACTTGT	1517
CCTCTAACCT CCCCAGGTAT GGGGCGCATG TGCACACACA AATAAGTAAA TGTAATCTTT	1577
AAACAGTTAA AAAGACTAAC TGGTGATCTT TGAGACTAGA TTTGTATTTT TTTTTC	1634

配列番号： 5

配列の長さ： 5 0 6

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 蛋白質

配列

Met	Ala	Asp	Ser	Lys	Pro	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Gly	Asp	Pro	Val	Pro
1				5					10					15	
Val	Glu	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Val	Phe	Gly	Ile	Val	Val	Asp	Glu	Ala
			20						25					30	
Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ser	Glu	Lys	Val	Cys	Glu	Trp	Lys	Glu
		35						40					45		
Pro	Glu	Glu	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Glu	Leu	Gln	Ser	Gln	Gly
		50					55					60			
Glu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Arg	Cys	Arg	Ala	Val	Ile	His	Tyr
	65					70				75				80	
Ser	Val	Lys	Thr	Gly	His	Pro	Arg	Phe	Phe	Asn	Gln	Leu	Phe	Ser	Gly
				85					90					95	
Leu	Asp	Pro	His	Ala	Leu	Ala	Gly	Arg	Ile	Ile	Thr	Glu	Ser	Leu	Asn
			100						105					110	
Thr	Ser	Gln	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Ile	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Leu	Met	Glu
		115						120					125		
Glu	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Trp	Asn	Thr	Gly
		130					135					140			
Asp	Gly	Val	Phe	Cys	Pro	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Ile
145					150					155				160	

Asn Leu Ala Arg Phe Gln Arg Tyr Pro Asp Cys Lys Gln Arg Gly Leu			
165	170	175	
Arg Ala Leu Pro Pro Leu Ala Leu Phe Thr Ser Lys Glu Cys His Tyr			
180	185	190	
Ser Ile Thr Lys Gly Ala Ala Phe Leu Gly Leu Gly Thr Asp Ser Val			
195	200	205	
Arg Val Val Lys Ala Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Glu Asp Leu			
210	215	220	
Glu Arg Gln Ile Ser Leu Ala Glu Ala Glu Gly Ser Val Pro Phe Leu			
225	230	235	240
Val Ser Ala Thr Ser Gly Thr Thr Val Leu Gly Ala Phe Asp Pro Leu			
245	250	255	
Asp Ala Ile Ala Asp Val Cys Gln Arg His Gly Leu Trp Leu His Val			
260	265	270	
Asp Ala Ala Trp Gly Gly Ser Val Leu Leu Ser Arg Thr His Arg His			
275	280	285	
Leu Leu Asp Gly Ile Gln Arg Ala Asp Ser Val Ala Trp Asn Pro His			
290	295	300	
Lys Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Arg Asp			
305	310	315	320
Thr Ser Asn Leu Leu Lys Arg Cys His Gly Ser Gln Ala Ser Tyr Leu			
325	330	335	
Phe Gln Gln Asp Lys Phe Tyr Asn Val Ala Leu Asp Thr Gly Asp Lys			
340	345	350	
Val Val Gln Cys Gly Arg Arg Val Asp Cys Leu Lys Leu Trp Leu Met			
355	360	365	

Trp Lys Ala Gln Gly Gly Gln Gly Leu Glu Trp Arg Ile Asp Gln Ala
370 375 380
Phe Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Glu Ile Lys Lys Arg Glu Gly
385 390 395 400
Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe
405 410 415
Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Ser Gln
420 425 430
Arg Leu Ser Gln Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Lys
435 440 445
Gly Thr Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Ala Asn Phe
450 455 460
Phe Arg Met Val Val Ala Asn Pro Ile Leu Val Gln Ala Asp Ile Asp
465 470 475 480
Phe Leu Leu Gly Glu Ala Gly Ala Ser Gly Pro Gly Pro Val Ser Cys
485 490 495
Phe Leu Ser Leu Pro His Pro Ser Ser Ala
500 505

配列番号：6

配列の長さ：2 1 2 1

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

CGCGCTCTGA ACCCGTCGTC TGAACCCTCT CTGAACCTTC CTGAAGCTGG AAGATTTCAC	60
CCTG ATG GCT GAC TCA AAA CCA CTC AGA ACC CTG GAT GGG GAC CCT GTG	109
CCT GTG GAG GCT TTG CTC CGG GAC GTG TTT GGG ATT GTC GTA GAT GAG	157
GCC ATT CGG AAG GGG ACC AAT GCC TCT GAG AAG GTC TGC GAA TGG AAG	205
GAG CCT GAA GAG CTC AAG CAG CTG CTG GAC TTG GAG CTG CAG AGC CAG	253
GGC GAG TCT AGG GAG CGG ATC CTG GAG CGC TGC CGG GCT GTG ATT CAT	301
TAC AGT GTC AAG ACT GGT CAC CCC CGG TTC TTC AAC CAG CTC TTC TCA	349
GGA TTA GAT CCC CAT GCT CTG GCC GGG CGC ATC ATT ACG GAG AGC CTC	397
AAT ACC AGC CAG TAC ACA TAT GAG ATT GCC CCC GTG TTT GTG CTC ATG	445
GAA GAG GAG GTG CTG AAG AAA CTC CGT GCC CTT GTG GGC TGG AAC ACT	493
GGG GAT GGG GTC TTC TGT CCT GGT GGT TCC ATC TCT AAC ATG TAC GCC	541
ATA AAC CTG GCC CGC TTT CAG CGC TAC CCA GAC TGC AAG CAG AGG GGC	589
CTC CGG GCC CTG CCA CCC TTG GCC CTC TTC ACT TCA AAG GAG TGC CAC	637
TAC TCC ATC ACC AAG GGA GCT GCT TTT CTG GGA CTT GGC ACC GAC AGT	685
GTC CGA GTG GTC AAG GCT GAT GAG AGA GGG AAG ATG ATC CCT GAG GAT	733
CTG GAG AGG CAG ATC AGT CTG GCA GAG GCT GAG GGC TCG GTG CCA TTT	781
CTG GTC AGT GCC ACC TCT GGT ACC ACC GTG CTA GGG GCC TTT GAC CCC	829
CTG GAT GCA ATT GCC GAT GTT TGC CAG CGT CAC GGG CTG TGG TTA CAC	877
GTG GAT GCC GCC TGG GGT GGG AGC GTC CTG CTG TCC CGG ACA CAC AGG	925
CAT CTC CTG GAT GGG ATC CAG AGG GCT GAC TCC GTG GCC TGG AAC CCT	973
CAC AAG CTT CTC GCC GCG GGG CTG CAG TGC TCT GCT CTT CTT CTC CGG	1021
GAC ACC TCG AAC CTG CTC AAG CGC TGC CAC GGG TCC CAG GCC AGC TAC	1069
CTC TTC CAG CAA GAC AAG TTC TAC AAC GTG GCT CTG GAC ACC GGA GAC	1117
AAG GTG GTG CAG TGT GGC CGC CGC GTG GAC TGT CTG AAG CTG TGG CTC	1165
ATG TGG AAG GCG CAG GGT GGG CAA GGG CTG GAG TGG CGC ATC GAC CAG	1213
GCC TTT GCT CTC ACT CGG TAC TTG GTG GAG GAG ATA AAA AAG CGG GAA	1261

GGA TTT GAG TTG GTC ATG GAG CCC GAG TTC GTC AAC GTG TGC TTC TGG 1309
 TTT GTG CCT CCC AGC CTG CGG GGG AAG AAG GAG AGC CCA GAT TAC AGC 1357
 CAG AGG CTG TCT CAG GTG GCC CCT GTG CTC AAG GAG CGC ATG GTG AAG 1405
 AAG GGA ACC ATG ATG ATC GGC TAC CAG CCC CAT GGG ACC CGG GCC AAC 1453
 TTC TTC CGA ATG GTG GTG GCC AAC CCC ATA CTG GTC CAG GCC GAT ATA 1501
 GAC TTC CTT CTG GGC GAG GCT GGA GCG TCT GGG CCA GGA CCT GTG AGC 1549
 TGC TTC CTC TCT CTG CCC CAC CCA AGC TCT GCA TAA GCTCCTG GGTTCCTG 1602
 AGCGACCTTT CTAGGAAACA GTGGCCTTGA CTGTGTGAGC CCCCACACAC TAACTCTCCT 1662
 AGCTAAGTAT TGGCTGCCAG ACGGTGTCTA AGCACACTAC AGTCTGTTCT TACGAAATGT 1722
 GCTTCTTTTA AGTCGGTCAT AGTGGTACAC ACCGTTAATA CCAGCACTGG GGAGGCAGAG 1782
 GCAGACACAA GCAGATCTCT TGAGTTTGAG GCCAGCCTGG TCTACAGAGC TGGCCTACAC 1842
 AGAAAAAAAA CCTGTCTCAA AAAAAAAGAA AGGAAGGAAG AAAGAAAGGA AAAGAAAGAA 1902
 ATATTTTCA TTAAGATTAT GTCTATAAAA AATTGTTATT AATATGAGAG ATATGGTACG 1962
 ATGTATTAAG AAAGCTAGAT ATGGGGGTTG GGGATTTAGC TCAGTGGTAG AGCCCTTGCC 2022
 TAGGAAGCGC AAGGCCCTGG GTTCGGTCCC CAGCTTCGAA AAAAAGGAAC CACAAAAAAA 2082
 ACGGCCCCGCT CTAGAACTAG TGGATCCCCC GGCCTGCAG 2121

配列番号： 7

配列の長さ： 4 9 3

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 蛋白質

配列

Met Ala Asp Ser Glu Ala Leu Pro Ser Leu Ala Gly Asp Pro Val Ala

1 5 10 15

Val Glu Ala Leu Leu Arg Ala Val Phe Gly Val Val Val Asp Glu Ala

	20	25	30
Ile Gln Lys Gly Thr Ser Val Ser Gln Lys Val Cys Glu Trp Lys Glu			
35	40	45	
Pro Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu Asp Leu Glu Leu Arg Ser Gln Gly			
50	55	60	
Glu Ser Gln Lys Gln Ile Leu Glu Arg Cys Arg Ala Val Ile Arg Tyr			
65	70	75	80
Ser Val Lys Thr Gly His Pro Arg Phe Phe Asn Gln Leu Phe Ser Gly			
85	90	95	
Leu Asp Pro His Ala Leu Ala Gly Arg Ile Ile Thr Glu Ser Leu Asn			
100	105	110	
Thr Ser Gln Tyr Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Met Glu			
115	120	125	
Glu Glu Val Leu Arg Lys Leu Arg Ala Leu Val Gly Trp Ser Ser Gly			
130	135	140	
Asp Gly Ile Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Ser Asn Met Tyr Ala Val			
145	150	155	160
Asn Leu Ala Arg Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp Cys Lys Gln Arg Gly Leu			
165	170	175	
Arg Thr Leu Pro Pro Leu Ala Leu Phe Thr Ser Lys Glu Cys His Tyr			
180	185	190	
Ser Ile Gln Lys Gly Ala Ala Phe Leu Gly Leu Gly Thr Asp Ser Val			
195	200	205	
Arg Val Val Lys Ala Asp Glu Arg Gly Lys Met Val Pro Glu Asp Leu			
210	215	220	
Glu Arg Gln Ile Gly Met Ala Glu Ala Glu Gly Ala Val Pro Phe Leu			

225	230	235	240
Val Ser Ala Thr Ser Gly Thr Thr Val Leu Gly Ala Phe Asp Pro Leu			
245	250	255	
Glu Ala Ile Ala Asp Val Cys Gln Arg His Gly Leu Trp Leu His Val			
260	265	270	
Asp Ala Ala Trp Gly Gly Ser Val Leu Leu Ser Gln Thr His Arg His			
275	280	285	
Leu Leu Asp Gly Ile Gln Arg Ala Asp Ser Val Ala Trp Asn Pro His			
290	295	300	
Lys Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Leu Gln Asp			
305	310	315	320
Thr Ser Asn Leu Leu Lys Arg Cys His Gly Ser Gln Ala Ser Tyr Leu			
325	330	335	
Phe Gln Gln Asp Lys Phe Tyr Asp Val Ala Leu Asp Thr Gly Asp Lys			
340	345	350	
Val Val Gln Cys Gly Arg Arg Val Asp Cys Leu Lys Leu Trp Leu Met			
355	360	365	
Trp Lys Ala Gln Gly Asp Gln Gly Leu Glu Arg Arg Ile Asp Gln Ala			
370	375	380	
Phe Val Leu Ala Arg Tyr Leu Val Glu Glu Met Lys Lys Arg Glu Gly			
385	390	395	400
Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe			
405	410	415	
Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Gln Glu Ser Pro Asp Tyr His Glu			
420	425	430	
Arg Leu Ser Lys Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Glu			

435 440 445
 Gly Ser Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Gly Asn Phe
 450 455 460
 Phe Arg Val Val Val Ala Asn Ser Ala Leu Thr Cys Ala Asp Met Asp
 465 470 475 480
 Phe Leu Leu Asn Glu Leu Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu
 485 490

配列番号： 8

配列の長さ： 1 9 2 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： c D N A t o m R N A

配列

CGGCGCGCCT GTAATCCCAG CACTCTGGGA GACCGAGATT CTTGGTTGAT GCAAATCAAA	60
TAGAGATCCT G ATG GCT GAC TCA GAA GCA CTC CCC TCC CTT GCT GGG GAC	110
CCA GTG GCT GTG GAA GCC TTG CTC CGG GCC GTG TTT GGG GTT GTT GTG	158
GAT GAG GCC ATT CAG AAA GGA ACC AGT GTC TCC CAG AAG GTC TGT GAG	206
TGG AAG GAG CCT GAG GAG CTG AAG CAG CTG CTG GAT TTG GAG CTG CGG	254
AGC CAG GGC GAG TCA CAG AAG CAG ATC CTG GAG CGG TGT CGG GCT GTG	302
ATT CGC TAC AGT GTC AAG ACT GGT CAC CCT CGG TTC TTC AAC CAG CTC	350
TTC TCT GGG TTG GAT CCC CAT GCT CTG GCC GGG CGC ATT ATC ACT GAG	398
AGC CTC AAC ACC AGC CAG TAC ACA TAT GAA ATC GCC CCC GTG TTT GTG	446
CTC ATG GAA GAG GAG GTG CTG AGG AAA CTG CGG GCC CTG GTG GGC TGG	494
AGC TCT GGG GAC GGA ATC TTC TGC CCT GGT GGC TCC ATC TCC AAC ATG	542

TAT GCT GTA AAT CTG GCC CGC TAT CAG CGC TAC CCG GAT TGC AAG CAG 590
AGG GGC CTC CGC ACA CTG CCG CCC CTG GCC CTA TTC ACA TCG AAG GAG 638
TGT CAC TAC TCC ATC CAG AAG GGA GCT GCG TTT CTG GGA CTT GGC ACC 686
GAC AGT GTC CGA GTG GTC AAG GCT GAT GAG AGA GGG AAA ATG GTC CCC 734
GAG GAT CTG GAG AGG CAG ATT GGT ATG GCC GAG GCT GAG GGT GCT GTG 782
CCG TTC CTG GTC AGT GCC ACC TCT GGC ACC ACT GTG CTA GGG GCC TTT 830
GAC CCC CTG GAG GCA ATT GCT GAT GTG TGC CAG CGT CAT GGG CTA TGG 878
CTG CAT GTG GAT GCT GCC TGG GGT GGG AGC GTC CTG CTG TCA CAG ACA 926
CAC AGG CAT CTC CTG GAT GGG ATC CAG AGG GCT GAC TCT GTG GCC TGG 974
AAT CCC CAC AAG CTC CTC GCA GCA GGC CTG CAA TGC TCT GCA CTT CTT 1022
CTC CAG GAT ACC TCG AAC CTG CTC AAG CGC TGC CAT GGG TCC CAG GCC 1070
AGC TAC CTT TTC CAG CAG GAC AAG TTC TAC GAT GTG GCT CTG GAC ACG 1118
GGA GAC AAG GTG GTG CAG TGT GGC CGC CGT GTG GAC TGT CTG AAG CTG 1166
TGG CTC ATG TGG AAG GCA CAG GGC GAT CAA GGG CTG GAG CGG CGC ATC 1214
GAC CAG GCC TTT GTC CTT GCC CGG TAC CTG GTG GAG GAA ATG AAG AAG 1262
CGG GAA GGG TTT GAG CTA GTC ATG GAG CCT GAG TTT GTC AAT GTG TGT 1310
TTC TGG TTC GTA CCC CCC AGC CTG CGA GGG AAG CAG GAG AGT CCA GAT 1358
TAC CAC GAA AGG CTG TCA AAG GTG GCC CCC GTG CTC AAG GAG CGC ATG 1406
GTG AAG GAG GGC TCC ATG ATG ATT GGC TAC CAG CCC CAC GGG ACC CGG 1454
GGC AAC TTC TTC CGT GTG GTT GTG GCC AAC TCT GCA CTG ACC TGT GCT 1502
GAT ATG GAC TTC CTC CTC AAC GAG CTG GAG CGG CTA GGC CAG GAC CTG 1550
TGA GCCTTCTCTG TCTTGCTGCC GGCCTTGATA CCACCCCTCA CCCGCAGAGT 1603
CACTGCATTC CCTCCCAGCC TTTGAGGCCG GGTGCAGTGG CTCACGCCTG TAATCCCAGC 1663
ACTTTGGGAG GCCGAGGCGG GTGGATCACT TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGGCC 1723
AATAAGGTGA AACCTGTCT CTAATAAAAA TACAAAAATT AGCCGAGCAT GGTGGCCTGT 1783
GCCTGTAAAC CCAGCTACTC AGGAGGTTGG GGCAGAATTG CTTGAACCCA GGGGGCAGAG 1843

GTTGCAGTGA GCCGAGATTG CACCCCTGCA CTCCAGGCTG GGCAACAGTA CGAGACTCTG 1903
TTCCAAAAAA AATAAAAAAG CCG 1926

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。
2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質。
3. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードする mRNA が正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする請求項 2 に記載の蛋白質。
4. 請求項 1 ～ 3 のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなる DNA。
5. 請求項 1 ～ 3 のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなる DNA であって、かつ該 DNA が該蛋白質の全部をコードする RNA とハイブリダイズすることを特徴とする DNA。
6. 配列表の配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA。
7. 配列表の配列番号 2 で表される塩基配列の 500 番目の A から 2520 番目の A までの塩基配列を含む DNA。
8. 配列表の配列番号 2 で表される塩基配列の 515 番目の A から 1315 番目の C までの塩基配列を含む DNA。
9. 配列表の配列番号 2 で表される塩基配列の 1 番目の C から 499 番目の T までの塩基配列を含む DNA。
10. 請求項 1 ～ 3 のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する 12 塩基以上から成り且つ GC 含有率が 30 ～ 70 % である DNA。
11. 請求項 1 ～ 3 のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する 16 塩基以上から成り且つ GC 含有率が 30 ～ 70 % である DNA。

12. 配列表の配列番号2で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。
13. 配列表の配列番号2で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。
14. 化学修飾された請求項4～13のいずれか一つに記載のDNA。
15. 請求項4～13のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNA。
16. 請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNA。
17. 請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。
18. 請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。
19. 化学修飾された請求項16～18のいずれか一つに記載のRNA。
20. 請求項16～18のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNA。
21. 請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。
22. ヒトCRTI及びラットのCRTIに反応することを特徴とする請求項21に記載の抗体。
23. 請求項1～3のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、請求項21又は22に記載の抗体を用いる方法。
24. 哺乳動物の組織中に存在する請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質を請求項21又は22に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。
25. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項24に記載のガンの検出方法。
26. 請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、請求項4～14のいずれかに記載のDNAをプローブとして

用いることを特徴とする検出方法。

27. 哺乳動物の組織中に存在する請求項1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを請求項4～14のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。

28. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項27に記載のガンの検出方法。

29. 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。

30. 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質。

31. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする請求項30に記載の蛋白質。

32. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNA。

33. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNA。

34. 配列表の配列番号4で表される塩基配列を含むDNA。

35. 配列表の配列番号4で表される塩基配列の25番目のAから924番目のGまでの塩基配列を含むDNA。

36. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

37. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。
38. 配列表の配列番号4で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。
39. 配列表の配列番号4で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。
40. 化学修飾された請求項32～39のいずれか一つに記載のDNA。
41. 請求項32～39のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNA。
42. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNA。
43. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。
44. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。
45. 化学修飾された請求項42～44のいずれか一つに記載のRNA。
46. 請求項42～44のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNA。
47. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。
48. 請求項29～31のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、請求項47に記載の抗体を用いる方法。
49. 哺乳動物の組織中に存在する請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質を請求項47に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。

50. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項49に記載のガンの検出方法。

51. 請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、請求項32～40のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法。

52. 哺乳動物の組織中に存在する請求項29～31のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを請求項32～40のいずれか一つに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。

53. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項52に記載のガンの検出方法。

54. 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。

55. 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質。

56. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする請求項55に記載の蛋白質。

57. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNA。

58. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNA。

59. 配列表の配列番号6で表される塩基配列を含むDNA。

60. 配列表の配列番号6に記載の塩基配列の65番目のAから1582番目

のAまでの塩基配列を含むDNA。

61. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

62. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

63. 配列表の配列番号6で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

64. 配列表の配列番号6で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

65. 化学修飾された請求項57～64のいずれか一つに記載のDNA。

66. 請求項57～64のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNA。

67. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNA。

68. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。

69. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。

70. 化学修飾された請求項67～69のいずれか一つに記載のRNA。

71. 請求項67～69のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNA。

72. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。

73. ラットGAD I Iに反応することを特徴とする請求項72に記載の抗体。

74. 請求項54～56のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、請求項72又は73に記載の抗体を用いる方法。

75. 哺乳動物の組織中に存在する請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質を請求項72又は73に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。

76. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項75に記載のガンの検出方法。

77. 請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、請求項57～65のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法。

78. 哺乳動物の組織中に存在する請求項54～56のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを請求項57～65のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。

79. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項78に記載のガンの検出方法。

80. 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。

81. 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸であって、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質。

82. サブトラクション法によって検出されうるレベルにて、該蛋白質をコードするmRNAが正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする請求項81に記載の蛋白質。

83. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNA。

84. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNA。

85. 配列表の配列番号8で表される塩基配列を含むDNA。

86. 配列表の配列番号8に記載の塩基配列の72番目のAから1550番目のGまで塩基配列を含むDNA。

87. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

88. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

89. 配列表の配列番号8で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

90. 配列表の配列番号8で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。

91. 化学修飾された請求項83～90のいずれか一つに記載のDNA。

92. 請求項83～90のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNA。

93. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNA。

94. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。

95. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA。

96. 化学修飾された請求項93～95のいずれか一つに記載のRNA。
97. 請求項93～95のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNA。
98. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。
99. ヒトGAD I Iに反応することを特徴とする請求項98に記載の抗体。
100. 請求項80～82のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、請求項98又は99に記載の抗体を用いる方法。
101. 哺乳動物の組織中に存在する請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質を請求項98又は99に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。
102. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項102に記載のガンの検出方法。
103. 請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、請求項83～91のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法。
104. 哺乳動物の組織中に存在する請求項80～82のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを請求項83～91のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法。
105. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする請求項104に記載のガンの検出方法。

図 1 A



図 1 B

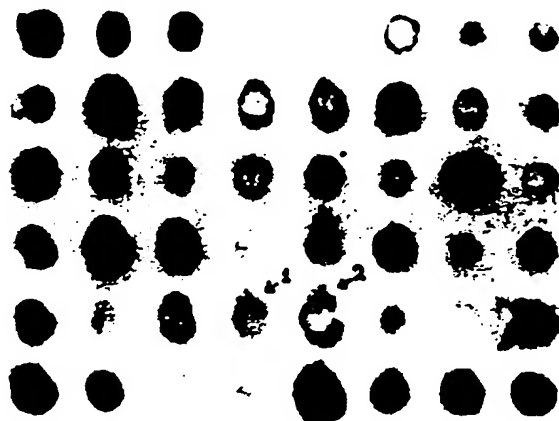


図 2

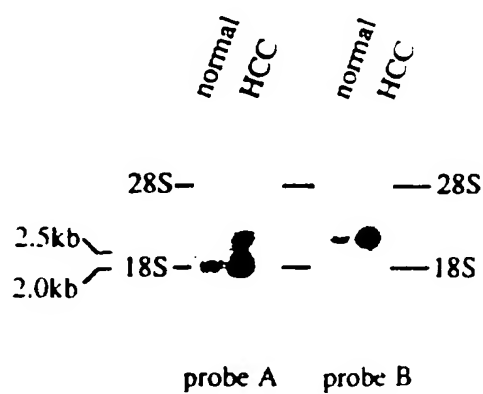


図 3

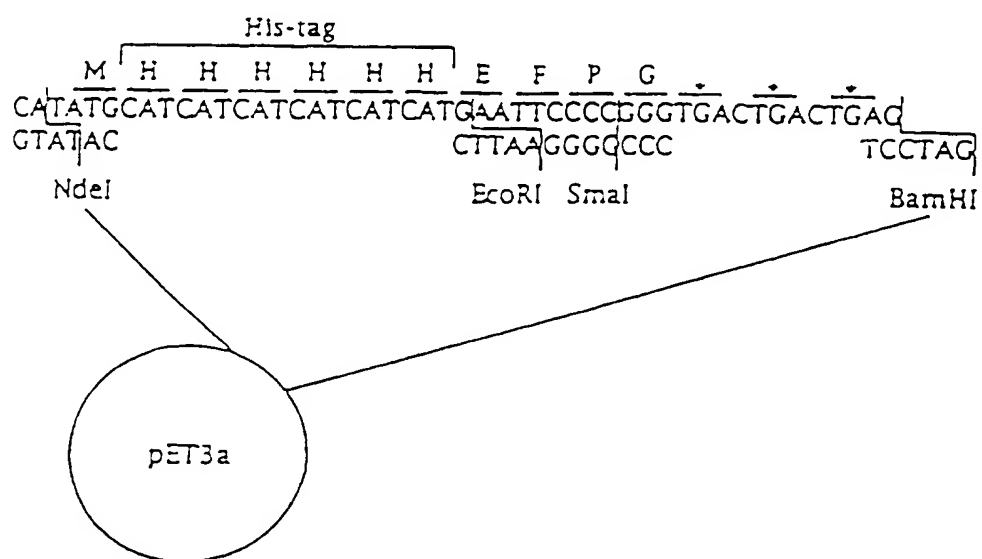


図 4



-2

-1



図 5

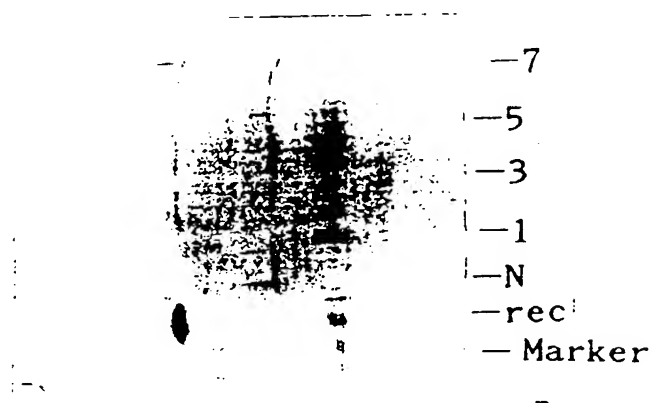


図 6

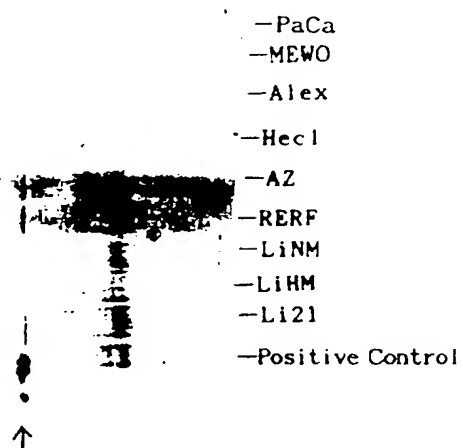


図 7

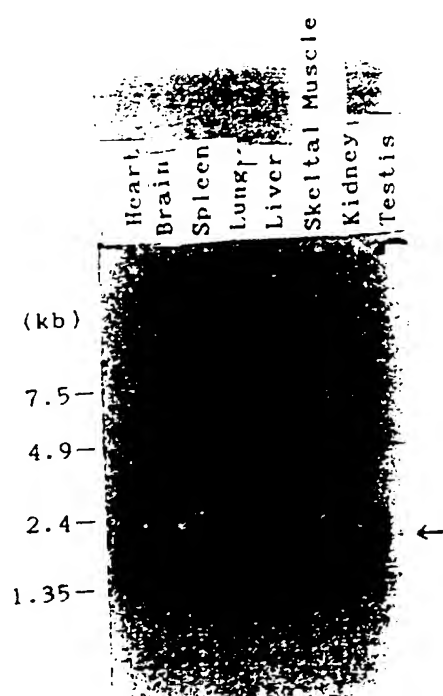


図 8

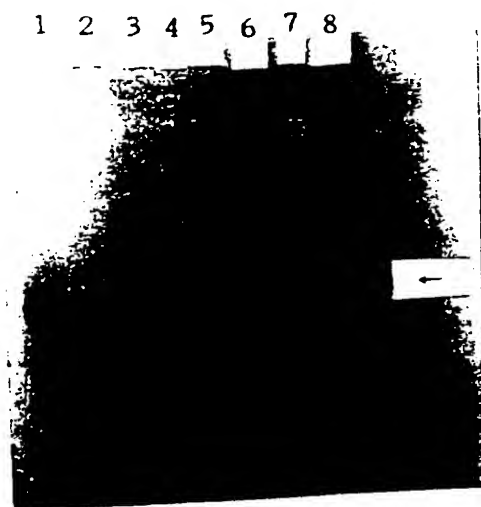


図 9

1 2 3 4 5 6 7 8



● ● ● ● ← 9

図 10

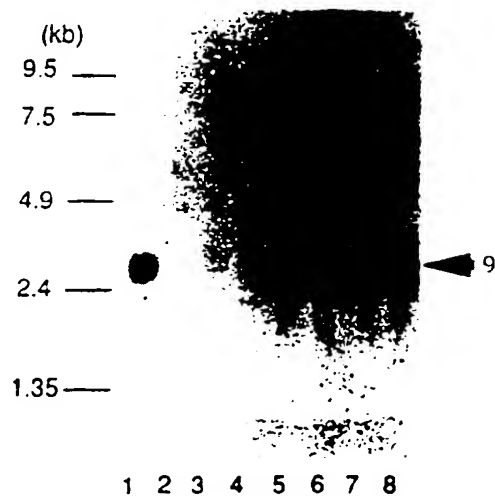


図 1 1

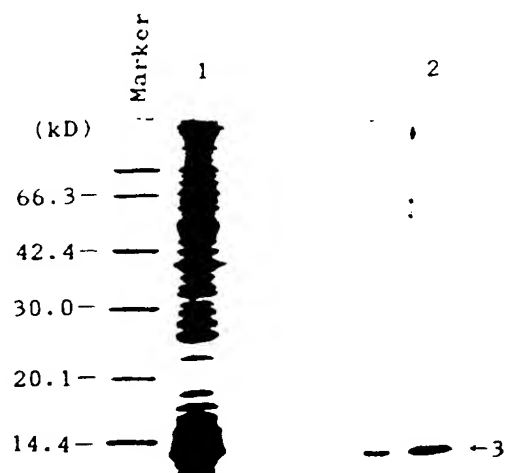


図 1 2

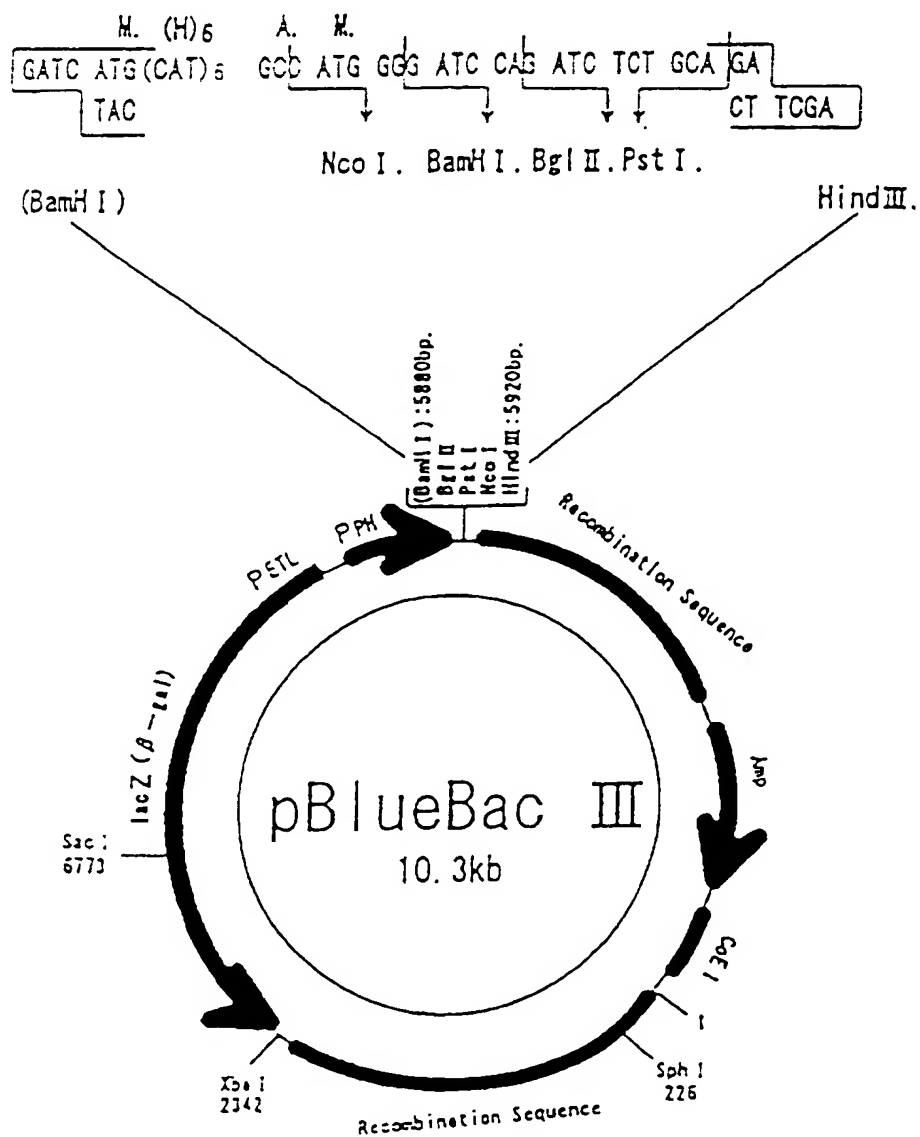


図 13

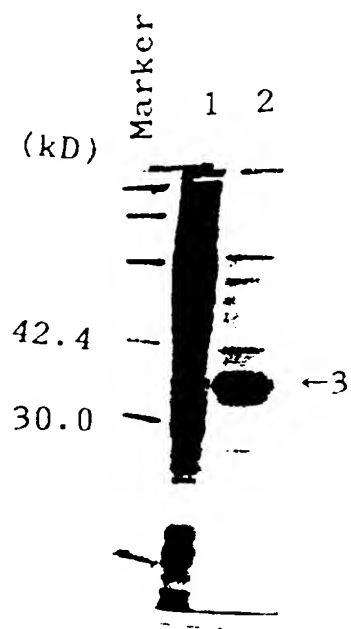


図 1 4

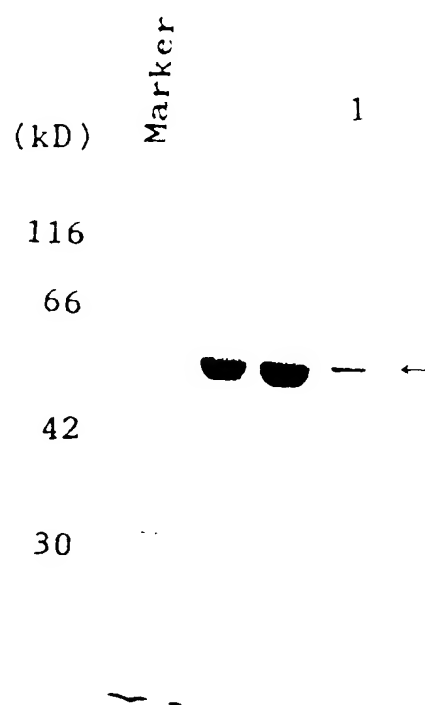


図 15A

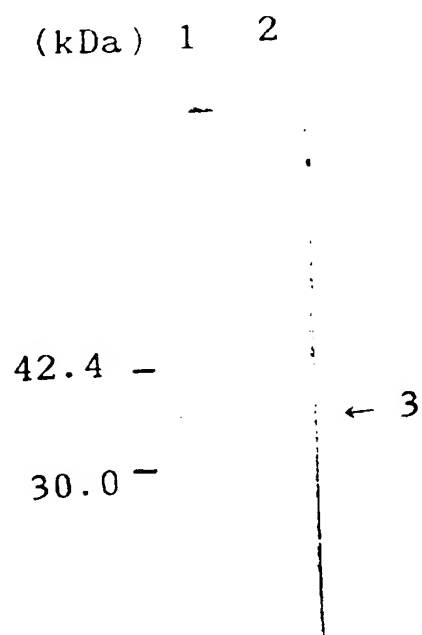


FIG 15 B

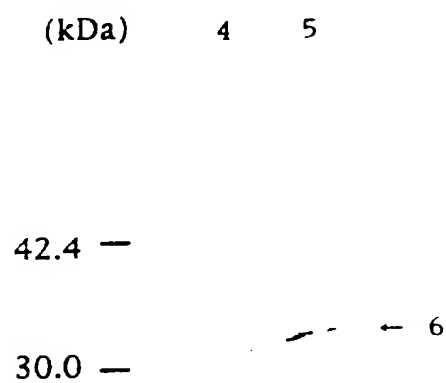


図 16

1 2 3 4 5 6 7 8

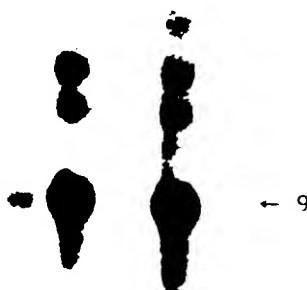
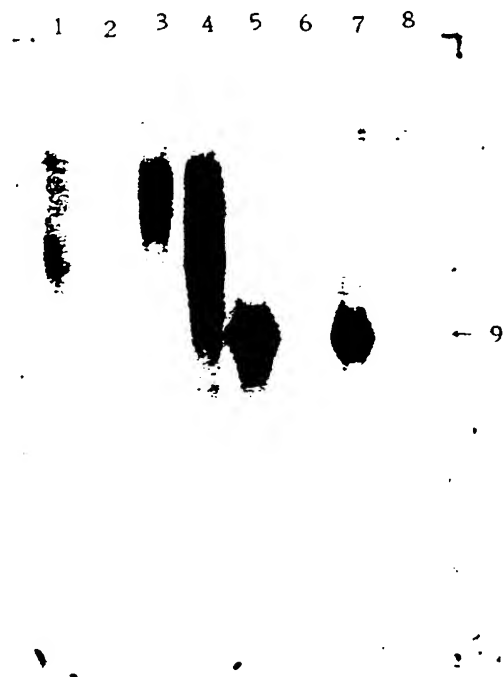


図 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, G01N33/53,
G01N33/574, G01N33/577, C07K14/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, G01N33/53,
G01N33/574, G01N33/577, C07K14/82

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PA	Kishimoto T. et al. "HTF:A B-ZIP Transcription Factor That Is Closely Related to the Human XBP/TREB5 and is Activated by Hepatocellular Carcinoma in Rats" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996, Jun.) Vol. 223, p. 746-751	1 - 28 29 - 53
X A	Kaisakia P.J. et al. "Cloning and characterization of rat cysteine sulfinic acid decarboxylase" Biochem. Biophys. Acta (1995, Mar.) Vol. 1262, p. 79-82	55-79, 81-105 54, 80
PX PA	Reymond I. et al. "Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding rat liver cysteine sulfinic acid decarboxylase(CSD)" Biochem. Biophys. Acta (1996, Jun.) Vol. 1307, p. 152-156	55-79, 81-105 54, 80
T	Kishimoto, T. et al. "Overexpression of cysteine sulfinic acid decarboxylase stimulated by hepatocarcinogenesis results in autoantibody production in rats" Cancer Res. (1996, Nov.)	54 - 105

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
January 17, 1997 (17. 01. 97)

Date of mailing of the international search report
January 28, 1997 (28. 01. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02654

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Vol. 56, No. 22, p. 5230-5237	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/11, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/577, C07K14/82

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/11, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/577, C07K14/82

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PA	Kishimoto T. et al. "HTF: A B-ZIP Transcription Factor That Is Closely Related to the Human XBP/TREB5 and is Activated by Hepatocellular Carcinoma in Rats" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996, Jun.) 第223巻 p. 746-751	1-28 29-53
X A	Kaisakia P. J. et al. "Cloning and characterization of rat cysteine sulfinic acid decarboxylase" Biochem. Biophys. Acta (1995, Mar.) 第1262巻 p. 79-82	55-79, 81-105 54, 80
PX PA	Reymond I. et al. "Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding rat liver cysteine sulfinate decarboxylase (CSD)" Biochem. Biophys. Acta (1996, Jun.) 第1307巻 p. 152-156	55-79, 81-105 54, 80

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 01. 97

国際調査報告の発送日

28.01.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B 9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	Kishimoto, T. et al. "Overexpression of cysteine sulfinic acid decarboxylase stimulated by hepatocarcinogenesis results in autoantibody production in rats" Cancer Res. (1996, Nov.) 第56巻 第22号 p. 5230-5237	54-105